BIOCHEMISCHE ZEITSCHRIFT

UNTER MITWIRKUNG
ZAHLREICHER FACHGENOSSEN

HERAUSGEGEBEN
VON
W. GRASSMANN
DRESDEN

301. BAND. 3. HEFT

AUSGEGEBEN AM 31. JANUAR 1941

BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1941

Die

Biochemische Zeitschrift

Springer

307. Band — 3. Heft

	Seite
Filigge, Eberhard. Über die bildungsphysiologische Bedeutung des Jods. Hierzu zwei Tafeln	173
Hanzlik, St. Beiträge zur Bestimmung des Chlors bzw. Fluors in chlorhaltigen bzw. fluorhaltigen Stoffen	184
Hielscher, Fiedr. Experimentelle Untersuchungen über die Atmungsorgane der Insekten mit besonderer Berücksichtigung der Atmung der Puppen auf Hefe	187
Deuchteil, Edmund, und Karl Friedrich. Über die Verteilung von Eisen in Cytochrom	194
Klose, Manfred. Die Adsorption von Wasser durch Kohle	207
Virtanen, Artturi I., Pekka Hietala und Yrjö Wichmann. Über die Reduktionsenzyme	215
Yamafuji, K., Einwirkung von Natriumsulfit und Natriumthiosulfat auf die Katalase des Blutes	220
Kamp, Friedrich.	226
Pierantoni, U., und [illegible] der Bestimmung des [illegible]	245
Berichtigung	248

Über die biologische Wertung der Eiweißstoffe am Beispiel des Reiseiweißes*.

Von

Eberhard Flügge.

(Aus den Seminaristischen Übungen für pathologische Physiologie an der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 23. Oktober 1940.)

Der ernährungsphysiologische Wert eines Eiweißes oder einer bestimmten Eiweißmischung setzt sich, wie *A. Bickel* (1) in der Schlußbetrachtung seiner Schrift „Über die Beziehungen der Qualität des Nahrungseiweißes zum Ablauf des Betriebsstoffwechsels" aufzeigt, aus einer Reihe einzelner Komponenten zusammen und es ist heute nicht mehr angängig, den „biologischen Wert" eines Eiweißes schlechthin mit dem Werte zu identifizieren, den es für das Körperwachstum und die Regeneration, also allein für den Baustoffwechsel besitzt. Man muß vielmehr bei der Beurteilung dieses Wertes *alle* Funktionen berücksichtigen, die das Nahrungseiweiß im *Gesamt*stoffwechsel zu erfüllen hat, nämlich in seinen beiden, randständig verflochtenen Teilen: im *Baustoff*wechsel und im *Betriebsstoff*wechsel. Gerade in letzterem sind die dem Nahrungseiweiß gestellten Aufgaben recht mannigfaltige und unter ihnen steht die dauernd den Stoffwechselablauf beherrschende dynamisch-regulatorische Wirkung der zur Resorption gelangenden Eiweißderivate, vor allem der Aminosäuren, im Vordergrunde. Diese Wirkung bezieht sich, wie es *A. Bickel* in seiner obengenannten Schrift eingehend experimentell begründet hat, vor allem auf die Einregulierung einer bestimmten Oxydationslage. Er legt aber zugleich auch dar, daß daneben noch mannigfache andere Wirkungen in Frage kommen, unter denen er vor allem die Steuerung des Leberglykogengehaltes durch die Nahrungseiweißderivate genauer studiert hat. Sie besagt, daß der Glykogenbestand der Leber von den Derivaten des Nahrungseiweißes aus dem mit der Nahrung zugeführten Baumaterial für Glykogen, vor allem dem Kohlenhydrat, einreguliert wird. Und zwar geschieht dies unbeschadet der — normalerweise bei gemischter Kost auch unwesentlichen — Bedeutung des Nahrungseiweißes, gleichfalls Bausteinlieferant für Glykogen sein zu können. Sowohl für eine einzelne Aminosäure

* Die vorliegende Arbeit bringt zu dem aus ihrem Titel ersichtlichen Problem auszugsweise eine Reihe von Einzelstudien, meist Dissertationen, die von *Kohler*, *Repnow*, *Danopoulos*, *Atabay* und *Flügge* in den letzten Jahren in meinem Laboratorium ausgeführt wurden. *Bickel.*

(Tyrosin), die einer eiweißfreien Nahrung zugelegt wird, ist dieser steuernde Einfluß nachgewiesen [*Bickel* und *Haug* (2)], wie auch für Gemische chemisch reiner Aminosäuren [*Bickel* (16)].

Es wurden als wichtigste Funktionen des Nahrungseiweißes genannt: 1. Die Materialbelieferung des Körpers für Wachstum und Regeneration im Baustoffwechsel einschließlich der Bildung gewisser spezifischer Zellprodukte (Fermente, einige Hormone).

2. Die Regulatorenbelieferung des Körpers in Form der Aminosäuren für die Steuerung des Betriebsstoffwechsels, nämlich für die Einregulierung der Oxydationslage an der Seite von Hormonen, Vitaminen und Ionen, und die Einregulierung des Leberglykogengehalts.

Bei diesen Funktionen und wahrscheinlich noch vielen anderen Vorgängen kommt ebensowohl die Eiweißquantität wie auch die Eiweißqualität zur Geltung. Man kann deshalb für die Erfüllung jeder einzelnen Aufgabe von einer „wertgebundenen Menge" des Nahrungseiweißes sprechen.

Hinsichtlich des Baustoffwechsels ist bekanntlich für die Qualität des Eiweißes der Gehalt an bestimmten Aminosäuren maßgebend, die dem menschlichen Körper infolge seines eigenen Unvermögens, dieselben aufzubauen, mit der Nahrung fertig zugeführt werden müssen und von denen er eines bestimmten Quantums bedarf. Da diese Aminosäuren in dem einen Eiweiß reichlicher, in dem anderen spärlicher vertreten sind, ist demnach die Menge des benötigten Nahrungseiweißes seinem Gehalt an den genannten Aminosäuren annähernd umgekehrt proportional.

Wenn auch Wachstumsversuche an jungen Tieren mit dem Eiweiß, das uns in der vorliegenden Arbeit besonders beschäftigen soll, nicht vorzuliegen scheinen, so gibt es doch Erfahrungen über die Ergänzung der Abnutzungsquote durch Reiseiweiß beim erwachsenen Menschen. Setzt man den Wert desjenigen Eiweißes, das hinsichtlich seines Aminosäurengehalts dem Körpereiweiß am nächsten kommt (Fleisch und Milch), mit 100 an, so steht dem Reiseiweiß der Wert 88 zu [*Aaron* und *Gralka* (3)]. Für den Eiweißansatz im Wachstum ist diese Zahl jedoch nicht verwertbar, da hier die Anforderungen wesentlich höhere sind.

Hinsichtlich des Betriebsstoffwechsels ist die regulatorische Wirkung des Reiseiweißes in einigen Arbeiten aus dem *Bickel*schen Laboratorium genauer analysiert worden.

Zunächst untersuchte *H. Kohler* (4) an zwei Gruppen von je zehn weißen Ratten vergleichsweise zwei Diäten von annähernd gleichem N- und Kalorien-Gehalt, in denen entweder Reis oder Casein der Nahrungs-N-Träger war und das Kohlenhydrat in der Caseindiät von Zucker und Kartoffelstärke, in der Reisdiät von der Reisstärke geliefert wurde. Jeder Versuch bestand aus drei Perioden von je 7 Tagen und Harnanalysen an den letzten 5 Tagen jeder Periode. In der ersten Periode wurde die Caseindiät.

in den beiden letzten Perioden die Reisdiät verabfolgt. Die tägliche Nahrungsration wurde von den Tieren stets vollständig verzehrt. Das Körpergewicht der Tiere blieb während der Versuche völlig konstant.

Im einzelnen war die Zusammensetzung der Diäten die folgende:

Caseindiät.		*Reisdiät.*	
Casein	10 g	Polierter Reis	130 g
Lebertran	15 ccm	Lebertran	15 ccm
Rübenzucker	60 g	Salzgemisch *	2 g
Kartoffelstärke	60 g	Apfelsinensaft	10 ccm
Salzgemisch *	2 g	Wasser	600 ccm
Apfelsinensaft	10 ccm		
Wasser	600 ccm		

1 g Casein ..... = 0,125 g N
1 g Reis ..... = 0,0121 g N
1 g Kartoffelstärke ..... = 0,0008 g N

* Mc. Collum Nr. 185.

Die Zubereitung der Diäten erfolgte bei diesen, wie bei allen in dieser Arbeit mitgeteilten Versuchen derart, daß man aus sämtlichen Bestandteilen, mit Ausnahme der Vitaminträger, Lebertran und frischem Apfelsinensaft, einen Brei kochte, dem man beim Abkühlen die Vitaminträger zumischte.

Bestimmt wurde in den 24stündigen Harnmengen Harn-N nach der Halbmikromethode von *Kjeldahl*, Harn-C nach der Mikromethode von *Nicloux-Osuka* (5), Harn-Vakat-O nach der Mikromethode von *Müller-Kanitz* (6). Aus den gefundenen Werten wurden die Harnquotienten C : N und V : O : N berechnet. Die Harne waren stets eiweiß- und zuckerfrei.

Die Harnquotienten waren an den verschiedenen Analysentagen einer Periode sehr ähnlich, die Werte für C : N differierten gewöhnlich nur in der zweiten Dezimalstelle, die Schwankungen bei Vakat-O : N waren, wie üblich, etwas größer.

In der Tabelle I sind die Periodenmittelwerte zusammengestellt. Das Körpergewicht bezieht sich auf ein Tier, die C-, V.-O- und N-Werte auf zehn Tiere.

Tabelle I.

Periode Nr.	Körpergewicht in g	Harn-C in mg	Harn-Vakat-O in mg	Harn-N in mg	C : N	Vakat-O : N	Kot-N in g	Trocken-Kot in g
			Versuch I.					
I. Caseindiät	211	780	1271	709	1,10	1,79	0,58	12,8
II. Reisdiät	211	677	919	580	1,17	1,59	0,63	14,4
III. „	212	572	845	512	1,12	1,65	0,40	8,4
			Versuch II.					
I. Caseindiät	219	769	1072	670	1,15	1,60	0,67	15,9
II. Reisdiät	220	544	881	471	1,16	1,87	0,57	13,2
III. „	220	556	755	477	1,17	1,58	0,39	8,9

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß bei der Reisdiät genau dieselbe Oxydationslage eingehalten wurde wie bei der Caseindiät.

Im Anschluß an diese Studie untersuchte *Repnow* (7) vergleichsweise die Wirkung der vorstehend aufgeführten Diäten auf den Leberglykogengehalt an je 20 weißen Ratten, von denen je 10 Tiere 14 Tage und je 10 Tiere 15 Tage mit den Diäten ernährt worden waren. Die Glykogenbestimmung wurde an den Lebern von je 5 Tieren einer Gruppe, wie bei allen einschlägigen Versuchen der vorliegenden Arbeit, nach der von *O. Bösl* (8) modifizierten *Pflüger*schen Methode durchgeführt. Die Zuckerbestimmung wurde nach *Hagedorn-Jensen* gemacht.

Caseindiät				Reisdiät			
	Körpergewicht von 5 Tieren in g	Lebergewicht von 5 Tieren in g	% Glykogen-Dextrosegehalt der frischen Lebern		Körpergewicht von 5 Tieren in g	Lebergewicht von 5 Tieren in g	% Glykogen-Dextrosegehalt der frischen Lebern
1. Tag	1210	—	—	1. Tag	1245	—	—
14. „	1215	43,0	1,310	14. „	1250	48,5	1,775
1. Tag	1220	—	—	1. Tag	1230	—	—
14. „	1225	43,5	1,337	14. „	1235	47,8	1,659
1. Tag	1235	—	—	1. Tag	1190	—	—
15. „	1245	49,5	1,369	15. „	1195	45,4	1,634
1. Tag	1230	—	—	1. Tag	1195	—	—
15. „	1240	48,7	1,329	15. „	1205	46,0	1,658

Mittelwerte des Glykogen-Dextrosegehalts bei der Caseindiät: 1,336 %.
Mittelwerte des Glykogen-Dextrosegehalts bei der Reisdiät: 1,681 %.

Bei der Reisdiät enthielt also die Leber 25,9 % mehr Glykogen als bei der Caseindiät.

Eine Gegenüberstellung der Versuchsergebnisse der Arbeit von *Kohler* und derjenigen von *Repnow* zeigt:

Bei den korrespondierenden Versuchstiergruppen verhält sich bei gleicher Diätzusammensetzung die Reisdiät genau so wie die Caseindiät in bezug auf die Einregulierung der Oxydationslage, in bezug auf die Einregulierung des Leberglykogengehalts aber zeigen beide Diäten unterschiedliche Wirkungen, indem bei der Reisdiät eine größere Glykogenablagerung zustande kommt, als bei der Caseindiät.

Dieses Versuchsergebnis ist auffallend, und zwar aus dem Grunde, weil in der Regel diejenigen reinen Eiweiße und diejenigen eiweißhaltigen Nahrungsmittel, an die eine niedrige Harnquotientenlage gekoppelt ist — wie sie von dem Casein als Nahrungseiweiß unterhalten wird —, auch in der Richtung der Einregulierung eines niedrigen Leberglykogengehalts wirken, wie in der eingangs erwähnten Schrift *Bickels* (1) aus der dort veröffentlichten Tabelle (Tabelle XX, S. 67), und auch aus den neuerlichen Untersuchungen von *Bickel* und *Parlow* (9) über diesbezügliche Wirkungen der reinen Eiweißsubstanzen der Kartoffel (Tuberin) und der grünen Bohne hervorgeht. Die Reisdiät hätte also in den Versuchen von *Repnow* sich gegenüber der Glykogenversorgung der Leber genau so verhalten müssen wie die Caseindiät, da beide

Diäten in den Versuchen von *Kohler* die gleiche Oxydationslage unterhielten, die gleichen niedrigen Harnquotientenwerte erzeugten.

Im wesentlichen unterschied sich die Reisdiät von der Caseindiät durch die Art des Nahrungseiweißes und die des Kohlenhydrats. Auf die Oxydationslage wirkt sich bei der in den vorliegenden Fällen gewählten Zusammensetzung der Diäten allein die Nahrungseiweißqualität aus. Das wissen wir heute mit aller Bestimmtheit. Die soeben erwähnten Versuche mit den reinen Eiweißsubstanzen der Kartoffel und der grünen Bohne, sowie die vergleichsweise angestellten Experimente mit Kartoffel oder grüner Bohne oder Casein als Nahrungs-N-Träger haben das ganz offensichtlich erwiesen. Auf den Glykogenbestand der Leber aber kann bei einem definierten Eiweißgehalt der Nahrung sowohl die Qualität des Eiweißes, wie auch diejenige des Kohlenhydrats in der Nahrung von Einfluß sein. Das erstere wurde oben schon an Hand der dort genannten *Bickel*schen Tabellen dargetan. Das unterschiedliche glykogenisierende Vermögen von Kohlenhydraten ergibt sich aus einer Übersichtsdarstellung dieses Gebietes von *Pierce* (10). Danach gehört der in der Caseindiät vorhandene Rübenzucker (= Rohrzucker) zu den besten Glykogenlieferanten. Es ist also unwahrscheinlich, daß der geringere Glykogenbestand der Leber bei diesen Versuchen auf den Rohrzuckergehalt der Caseindiät zu beziehen ist. Dagegen liegt ein Unterschied in der glykogenisierenden Kraft der ebenfalls in der Caseindiät vertretenen Kartoffelstärke und Reisstärke im Bereich der Möglichkeit. Diese Frage hat *Danopoulos* (11) im *Bickel*schen Laboratorium an weißen Ratten studiert, indem er unter Verwendung von Casein als Nahrungseiweiß bei sonst völlig gleicher Diätzusammensetzung Kartoffelstärke, Weizenstärke, Maisstärke oder Reisstärke als Kohlenhydrat verwandte. Die mit Reisstärke gefütterten Tiere hatten ceteris paribus 20 % Glykogen mehr in ihren Lebern als die übrigen, die unter sich fast genau denselben Leberglykogenbestand aufwiesen.

Bei den oben erwähnten Versuchen von *Repnow* betrug das Plus an Glykogen bei den mit der Reisdiät ernährten Tieren 25,9 %, war also etwas größer. Die physiologischen Schwankungen, denen der Leberglykogengehalt selbst bei sonst identischer Versuchsanordnung bei der gleichen Tierart unterworfen sein kann, wenn man zu verschiedenen Zeiten oder unter verschiedenen äußeren Bedingungen die Versuche vornimmt, sind nicht unbeträchtlich. Im Hinblick darauf mochte die Differenz von 5,9 %, die zwischen den Versuchen von *Danopoulos* und *Repnow* bestand, gewiß nicht viel zu bedeuten haben. Andrerseits war es doch erwünscht, genau zu wissen, ob der genannte Unterschied *lediglich* auf Konto der Kohlenhydratqualität zu setzen sei. Denn es konnte ja *neben* dem besseren glykogenisierenden Vermögen der Reisstärke auch das *Reiseiweiß* durch die Art seiner Steuerung des Leberglykogengehalts für dessen Steigerung sorgen. Die Versuche, die

diese Frage entscheiden sollten, habe ich auf Veranlassung von Professor *Bickel* an weißen Ratten gemacht und berichte darüber im folgenden.

Verglichen wurden in ihrer Wirkung auf den Leberglykogengehalt zwei Diäten an je 20 Ratten, die quantitativ und qualitativ den gleichen Kohlenhydratgehalt in Form von Reisstärke und Rübenzucker in Mischung von 2 : 1, den gleichen Fettgehalt in Form von Lebertran und die gleiche N-Menge hatten und auch hinsichtlich ihres Mineralstoff- und Vitamingehalts, wie ihres Kaloriengehalts annähernd identisch waren, deren Nahrungseiweiß (N × 6,25) aber qualitativ verschieden war; in der einen Diät war es Reiseiweiß, in der anderen Casein.

Futtertabelle für je 10 Ratten.

1 g Casein ..... = 0,1234 g N
1 g Reis ..... = 0,01227 g N
1 g Reisstärke ..... = 0,00128 g N

Es entsprachen:

10 g Casein mit 1,234 g N = 101 g Reis mit 1,234 g N,
0,94 g Casein mit 0,116 g N = 91 g Reisstärke mit 0,116 g N.

Demnach enthielten:

9,06 g Casein + 91 g Reisstärke = 1,118 + 0,116 = 1,234 g N.

Caseinnahrung				Reisnahrung			
	Menge in g	N-Gehalt in g	Kalorien		Menge in g	N-Gehalt in g	Kalorien
Casein	9,06	1,118 g	37	Polierter Reis	101,00	1,234	360
Reisstärke ..	91,00	0,116 g	321	Rohrzucker .	30,00	—	123
Rohrzucker .	30,00	—	123	Salzgemisch .	2,00	—	—
Salzgemisch .	2,00	—	—	Lebertran ..	9,20	—	85
Lebertran ..	9,20	—	85	Tetravitol ..	0,50	—	4
Tetravitol ..	0,50	—	4	Wasser	700,00	—	—
Wasser	700,00	—	—			1,234	572
		1,234	570				

Versuche mit der Caseindiät an vier Gruppen von je 5 Ratten.

Versuchstag Nr.	Gruppe I (9tägige Fütterung)	Gruppe II (9tägige Fütterung)	Gruppe III (11tägige Fütterung)	Gruppe IV (11tägige Fütterung)
	Körpergewichte jeder Gruppe in g.			
1	740	740	765	765
3	740	740	765	765
5	740	740	760	750
7	740	740	760	750
9	740	740	760	750
11	—	—	760	750
	Gewichte der 5 frischen Lebern jeder Gruppe in g.			
	58,4	44,3	37,9	40,5
	Glykogentraubenzuckergehalt der 5 frischen Lebern jeder Gruppe.			
	3,895 %	3,749 %	3,920 %	3,703 %

Versuche mit der Reisdiät an vier Gruppen von je 5 Ratten.

Versuchstag Nr.	Gruppe I (9tägige Fütterung)	Gruppe II (9tägige Fütterung)	Gruppe III (11tägige Fütterung)	Gruppe IV (11tägige Fütterung)
	Körpergewichte jeder Gruppe in g.			
1	720	720	765	765
3	720	720	770	780
5	720	730	780	790
7	720	730	780	790
9	730	730	790	800
11	—	—	780	790
	Gewichte der 5 frischen Lebern jeder Gruppe in g.			
	42,8	44.6	49,5	50,9
	Glykogentraubenzuckergehalt der frischen Lebern jeder Gruppe.			
	5,612 %	5,524 %	5,555 %	5,772 %

Mittelwert des Glykogentraubenzuckergehaltes bei der Caseindiät: 3,817 %.
„ „ „ „ „ Reisdiät: 5,616 %.

Das Ergebnis meiner Versuche war eindeutig. *Die mit dem Reiseiweiß ernährten Tiere hatten in ihren Lebern 47,1 % mehr Glykogen als diejenigen, die das Casein erhalten hatten.*

Gewiß ist diese Differenz größer als bei den Versuchen von *Repnow* und *Danopoulos*. Ich wies indessen schon darauf hin, daß der Glykogenbestand der Leber bei Versuchen, die mit derselben Tierart zu verschiedenen Zeiten und damit in der Regel auch unter nicht völlig identischen äußeren Versuchsbedingungen angestellt werden, nicht unerhebliche Schwankungen erkennen lassen kann. Wir vermögen also nur zu sagen: *der Leberglykogengehalt erweist sich bei denjenigen Tieren, die die Reisstärke oder die Reisstärke und das Reiseiweiß im polierten Reiskorn erhielten, höher als bei den anderen. Und zwar trifft das dann zu, wenn ceteris paribus bei gleicher Nahrungseiweißart und -menge unter Verwendung von Casein die Reisstärke in bestimmter umfänglicher Weise das Kohlenhydrat in der Nahrung ist, oder wenn bei gleicher Eiweißmenge, aber unterschiedlicher Eiweißart entweder Casein oder Reiseiweiß das Nahrungseiweiß bildet und außerdem in definierter Menge die Reisstärke in diesen beiden Fällen das Kohlenhydrat darstellt.*

Obschon also das Reiseiweiß als Nahrungseiweiß dieselbe Oxydationslage wie das Casein unterhält, reguliert es dennoch einen höheren Glykogengehalt der Leber ein. Denn daß es sich bei diesen Glykogenversuchen mit unterschiedlichem Nahrungseiweiß bei der gegebenen Versuchsanordnung mit der überreichen Kohlenhydratspeisung des Körpers nur um regulatorische Wirkungen des Nahrungseiweißes bzw. seiner zur Resorption gelangenden Derivate handeln kann, dürfte kaum zu bestreiten sein.

Meine vorliegende Arbeit hat aber über den Beitrag, den sie zur Kenntnis des ernährungsphysiologischen Wertes des Reiseiweißes bringt, hinaus ein allgemeines biologisches Interesse. Sie gibt uns nämlich am Reiseiweiß ein Schulbeispiel, wie ein und dasselbe Eiweiß ganz verschiedene biologische Sonderwerte in bezug auf die Erfüllung von drei wichtigen Funktionen im Körper hat:

1. Für den Baustoffwechsel ist das Reiseiweiß ein Nahrungseiweiß von mittlerer Qualität.

2. Im Betriebsstoffwechsel erweist es sich als ein Nahrungseiweiß bester Qualität bei Einregulierung der Oxydationslage in der Richtung einer möglichst vollkommenen energetischen Ausnützung des zur Verbrennung gelangenden Gesamtmaterials.

3. Die Glykogenstapelung in der Leber erfährt trotz dieser Begünstigung der Verbrennungen, also des Umsatzes, einen fördernden regulatorischen Einfluß, entgegen allen Erwartungen.

Das Reiseiweiß ist bekanntlich keine einheitliche Substanz, sondern eine Mischung aus Albumin, Globulin, Prolamin, Orycenin und Amiden [*Osborn* (12), *Takahashi* und *Sate* (13)]. Die chemische Gesamtstruktur, ja schon diejenige des Orycenins [*Suzuki*, *Yoshimura* und *Fuye* (14)] ist gewiß völlig verschieden von derjenigen des Caseins; trotzdem muß sie in gewisser Richtung resultantenmäßig doch auch wieder so ähnlich derjenigen des Caseins sein, daß die identische Beeinflussung der Oxydationslage durch beide Eiweiße möglich wird.

In anderen Richtungen müssen stärkere Differenzen vorhanden sein. Das zeigt sich am Baustoffwechsel und an der Art der Steuerung des Leberglykogengehalts. Weil aber beim Reiseiweiß die Art der Steuerung der Oxydationen nicht in der üblichen Weise mit der Art der Steuerung des Leberglykogengehalts konform geht, muß die Struktur des Reiseiweißes noch irgendeine Besonderheit haben, die den meisten anderen Eiweißen abgeht, bei denen ein Parallelismus in jener Hinsicht besteht.

Eine Ergänzung und Bestätigung der beiden besprochenen Versuche, aus denen der fördernde Einfluß des Reises auf die Glykogenstapelung dank der Besonderheit seines Eiweißes und seines Kohlenhydrats hervorgeht, bringen auch Versuche, die H. Atabay (15) *in unserem Laboratorium ausführte.* Er verglich die Wirkung von N-äquimolekularen Diäten auf den Glykogengehalt der Leber, bei denen der Nahrungs-N entweder zu 100 % aus Reis-N oder zu 25 % aus Reis-N und 75 % aus Fleisch-N bestand. Das Kohlenhydrat wurde aus Reisstärke und Rohrzucker in verschiedenem gegenseitigem Verhältnis gebildet. Fleisch als Nahrungs-

N-Träger bewirkt eine Oxydationslage, die der vom Casein unterhaltenen entspricht. Es war daher zu erwarten, daß der partielle Ersatz des Reis-N durch Fleisch-N — ob auch der Reisstärke durch Rohrzucker ist bei dem ausgezeichneten Glykogenisierungsvermögen des Rohrzuckers fraglich — eine Senkung des Leberglykogengehalts bewirken würde. In der Tat war das auch das Ergebnis der *Atabay*schen Versuche, die der Vollständigkeit meiner Arbeit halber hier mitgeteilt werden sollen.

Versuche.

Drei Doppelgruppen von fünf bzw. vier Tieren mit annähernd gleichem Körpergewicht wurden mit den nachstehend verzeichneten Nahrungsgemischen gefüttert, die immer quantitativ verzehrt wurden. Die korrespondierenden Gruppen nahmen im Laufe des Versuchs in fast gleichmäßiger Weise an Körpergewicht zu. Nach 10- bzw. 13- bzw. 14tägiger Fütterung wurde zu jedem Termin eine Doppelgruppe mit den zu vergleichenden Ernährungsarten durch Genickschlag getötet, und es wurde in der Gesamtheit der Lebern jeder Einzelgruppe das Glykogen nach *Bösl-Pflüger* mit der anschließenden Zuckeranalyse nach *Hagedorn-Jensen* bestimmt.

Versuch I. Reis (100% Reis-N).
5 Ratten mit 10tägiger Fütterung.

Nahrung		N	Kalorien	Gewicht der 5 Tiere
Reis	54,0 g	0,56 g	185	1. Tag: 745 g
Lebertran	7,5 ccm		64	3. „ 748 g
Zucker	12,5 g		51,2	5. „ 750 g
Salzgemisch	1,0 g		—	7. „ 755 g
Citronensaft	5,0 g		—	10. „ 760 g
Wasser	300,0 ccm		—	
		0,56 g	etwa 300	

5 Tiere = 32,5 g Leber = 1,646% Glykogentraubenzucker. + 27,4% im Vergleich zur Kontrolle.

Reis und Hammelfleisch (etwa 25% Reis-N, 75% Fleisch-N).
5 Ratten mit 10tägiger Fütterung.

Nahrung		N	Kalorien	Gewicht der 4 Tiere
Frisches Hammelfleisch	15,0 g	0,41 g	48	1. Tag: 748 g
Reis	13,0 g	0,14 g	44,59	3. „ 750 g
Lebertran	7,5 ccm	—	64	5. „ 755 g
Zucker	42,5 g	—	174	7. „ 760 g
Salzgemisch	1,0 g	—	—	10. „ 765 g
Citronensaft	5,0 ccm	—	—	
	etwa			
Wasser	300,0 ccm	—	—	
		0,55 g	etwa 331	

5 Tiere = 32,5 g Leber = 1,289% Glykogentraubenzucker.

Versuch II. Reis (100% Reis-N).

4 Ratten mit 13tägiger Fütterung.

Nahrung		N	Kalorien	Gewicht der 4 Tiere
Reis	43,2 g	0,45 g	148	1. Tag: 720 g
Lebertran	6,0 ccm	—	51	3. „ 720 g
Zucker	10,0 g	—	41	5. „ 730 g
Salzgemisch	0,4 g	—	—	7. „ 735 g
Apfelsinensaft	4,0 ccm	—	—	9. „ 740 g
Wasser	150,0 ccm	—	—	11. „ 745 g
				13. „ 750 g
		0,45 g	etwa 240	

4 Tiere = 38,0 g Leber = 1,526% Glykogentraubenzucker. + 64,9% im Vergleich zur Kontrolle.

Reis und Hammelfleisch (etwa 25% Reis-N, 75% Fleisch-N).

4 Ratten mit 13tägiger Fütterung.

Nahrung		N	Kalorien	Gewicht der 4 Tiere
Frisches Hammelfleisch	12,0 g	0,33 g	38,5	1. Tag: 730 g
Reis	10,4 g	0,11 g	35,67	3. „ 730 g
Lebertran	6,0 ccm	—	51,3	5. „ 740 g
Zucker	34,0 g	—	139,4	7. „ 745 g
Salzgemisch	0,4 g	—	—	9. „ 750 g
Apfelsinensaft	4,0 ccm	—	—	11. „ 750 g
Wasser	150,0 ccm	—	—	13. „ 750 g
		0,44 g	etwa 265	

4 Tiere = 33,5 g Leber = 0,925% Glykogentraubenzucker.

Versuch III. Reis (100% Reis-N).

4 Ratten mit 14tägiger Fütterung.

Nahrung		N	Kalorien	Gewicht der 4 Tiere
Reis	43,2 g	0,45 g	148	1. Tag: 730 g
Lebertran	6,0 ccm	—	51	3. „ 730 g
Zucker	10,0 g	—	41	5. „ 735 g
Salzgemisch	0,4 g	—	—	7. „ 740 g
Apfelsinensaft	4,0 g	—	—	9. „ 745 g
Wasser	150,0 ccm	—	—	11. „ 750 g
				14. „ 750 g
		0,45 g	etwa 240	

4 Tiere = 37,00 g Leber = 1,621% Glykogentraubenzucker. + 51,5% im Vergleich zur Kontrolle.

Reis und Hammelfleisch (etwa 25% Reis-N, 75% Fleisch-N).
4 Ratten mit 14tägiger Fütterung.

Nahrung		N	Kalorien	Gewicht der 4 Tiere
Frisches Hammelfleisch	12,0 g	0,33 g	38,5	1. Tag: 725 g
Reis	10,4 g	0,11 g	35,67	3. „ 730 g
Lebertran	6,0 ccm	—	51,3	5. „ 735 g
Zucker	34,0 g	—	139,4	7. „ 740 g
Salzgemisch	0,4 g	—	—	9. „ 740 g
Apfelsinensaft	4,0 ccm	—	—	11. „ 750 g
Wasser	150,0 ccm	—	—	14. „ 750 g
		0,44 g	etwa 265	

4 Tiere = 35,5 g Leber = 1,070% Glykogentraubenzucker.

Literatur.

1) *A. Bickel*, Über die Beziehungen der Qualität des Nahrungseiweißes zum Ablauf des Betriebsstoffwechsels. Basel, Schweiz, Verlag B. Schwabe u. Cie., 1938. — 2) *A. Bickel* u. *A. Haug*, Deutsch. med. Wochenschr. Nr. 2, S. 53, 1939. — 3) *Aron* u. *Gralka*, Handbuch der Biochemie von C. Oppenheimer, 2. Aufl., **6**, 335, 1923. — 4) *H. Kohler*, Beobachtungen über den Einfluß des Reiseiweißes auf den Stoffwechsel. Dissertation Universität Berlin 1938. — 5) *Osuka*, diese Zeitschr. **246**, 104, 1932. — 6) *Kanitz*, ebenda **249**, 234, 1932; **257**, 361, 1933. — 7) *F. Repnow*, Vergleichende Untersuchung über die Wirkung von Casein und Reis als N-Träger in der gemischten Nahrung auf den Leberglykogengehalt. Dissertation Universität Berlin 1940. — 8) *O. Bösl*, diese Zeitschr. **202**, 299, 1928. — 9) *A. Bickel* u. *A. Parlow*, ebenda **304**, 105, 1940. — 10) *Pierce*, The J. of Nutrition **10**, No. 6 1935. — 11) *Danopoulos*, diese Zeitschr. **299**, 100, 1938. — 12) *Osborn*, zit. nach *König*, Chemie der Nahrungs- und Genußmittel **2**, 352, 833, 1920. — 13) *Takahashi* u. *Sato*, zit. nach Chem. Centralbl. **1913**, II, 1321. — 14) *Suzuki*, *Yoshimura* u. *Fuyi*, zit. nach *Abderhalden*, Biochem. Handlexikon **4**, 48, 1911; **14**, 78, 1933. — 15) *H. Atabay*, Methodologische Untersuchungen zur Lehre von dem Einfluß der Qualität des Nahrungseiweißes auf den Ablauf des Zwischenstoffwechsels. Dissertation Universität Berlin 1938. — 16) *A. Bickel*, diese Zeitschr. **306**, 245, 1940.

Beiträge zur Bestimmung der Brenztraubensäure in Gegenwart von Glucose bzw. Fructose in alkalischem Milieu[1].

Von

St. Huszák.

(Aus dem Hirnforschungsinstitut der Königl.-ung. Franz Josef-Universität.)

(Eingegangen am 14. November 1910.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Von den Methoden, welche zum Nachweis der Brenztraubensäure aus Gewebsextrakten dienen, scheint sich die von *Straub* (1) angegebene infolge ihrer Spezifität und schnellen Ausführbarkeit am besten zu bewähren. Ich machte jedoch die Erfahrung, daß bei quantitativen Bestimmungen in glucosehaltigem Milieu auch dieser Methode ein beträchtlicher Fehler anhaftet, da eine erhebliche Abnahme der Brenztraubensäurewerte zu beobachten ist.

Bei der Ausführung der Reaktion folgte ich den Anweisungen von *Straub*.

Zu 1 ccm der zu untersuchenden Lösung wird 1 ccm KOH (100 g KOH in 60 ccm Wasser gelöst) und 0,5 ccm Salicylaldehydlösung (2 Vol.-% Salicylaldehyd in 100 ccm 96 %igem Alkohol) gegeben, gründlich durchgeschüttelt und im Wasserbad von 37° C 10 Minuten lang erwärmt, danach auf Zimmertemperatur abgekühlt. Zur Kolorimetrierung gebrauchte ich das *Pulfrich*-Stufenphotometer von *Zeiss* mit einer Küvette von 0,1 mm Durchmesser und dem Lichtfilter S 47. Das Resultat der Ablesungen wurde unter Vergleich mit einer auf Grund bekannter Brenztraubensäuremengen hergestellten empirischen Kurve ausgewertet. Die entsprechenden Kontrollen mit Glucose nahmen im Wasserbad infolge der starken Alkalität eine gelbe Farbe an, deren Extinktion gegen Wasser bestimmt und in Abzug gebracht wurde. Die im Vakuum zweimal destillierte Brenztraubensäure wurde in Form ihres Natriumsalzes benutzt.

Resultate.

Wenn man zu gleichen Mengen Brenztraubensäure steigende Mengen Glucose oder Fructose gibt, dann nimmt die mit der Salicylaldehydmethode bestimmbare Menge der Brenztraubensäure ab. Die Ergebnisse wurden in Abb. 1 dargestellt. Auf der Ordinate sind die Brenztraubensäurewerte, auf der Abszisse die zugesetzten Glucose- bzw.

[1] Diese Untersuchungen wurden mit Unterstützung des ungarischen naturwissenschaftlichen Forschungssenats ausgeführt.

Fructosemengen aufgetragen. Wie aus Abb. 1 zu sehen ist, vermindert sich bei einer zehnfachen Glucosekonzentration der Brenztraubensäurewert um 43 %. Mit Fructose erhält man ungefähr das gleiche Ergebnis.

Die Abnahme der Brenztraubensäure in Gegenwart von Zucker wird man in erster Linie damit zu erklären suchen, daß der Zucker mit dem Salicylaldehyd in Reaktion tritt. Um dies zu prüfen, wurde zur Glucose bzw. Fructose unter den obengenannten Versuchsbedingungen Salicylaldehyd gegeben, dessen Menge nach Neutralisation kolori-

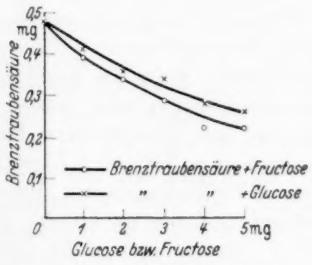

Abb. 1.

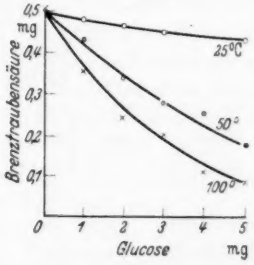

Abb. 2.

metrisch auf Grund der Ferrichlorid-Farbenreaktion bestimmt wurde. Ein Unterschied gegenüber der Kontrolle ließ sich jedoch nicht feststellen.

Es wurde daher angenommen, daß Brenztraubensäure und Glucose im stark alkalischen Milieu so miteinander reagieren, daß die Atomgruppe ($-CH_3CO-$), welche die Salicylaldehydreaktion gibt, verschwindet. Die Beobachtungen zeigten auch, daß mit Erhöhung der Laugenkonzentration und der Temperatur die bestimmbaren Brenztraubensäuremengen in Gegenwart von Glucose bzw. Fructose sinken. Diese Verhältnisse sind aus Abb. 2 zu ersehen. Bei Anwendung von Fructose erhält man ähnliche Kurventypen.

Weitere Versuche, welche mit anderen Brenztraubensäurebestimmungsmethoden, so mit der Nitroprussidnatriumreaktion und der titrimetrischen Methode nach *Clift* und *Cook* (2) angestellt wurden, führten zu gleichen Ergebnissen, wenn das Reaktionsgemisch mit konzentrierter Lauge erwärmt wurde. Bei der Nitroprussidnatriumreaktion findet man in Gegenwart von Glucose auch dann eine Abnahme der Brenztraubensäure, wenn das Reaktionsgemisch — statt Erwärmens mit konzentrierter Lauge — mit überschüssigem Ammoniumhydroxyd behandelt und bei Zimmertemperatur stehengelassen wird. Das Nitroprussidnatriumverfahren ist zwar sehr empfindlich, wegen der Unbeständigkeit der Farbe für eine kolorimetrische Bestimmung jedoch

nicht anwendbar. Die Ergebnisse, welche mit der titrimetrischen Methode von *Clift* und *Cook* erhalten wurden, sind in Abb. 3 dargestellt.

Wie aus dem Vorhergehenden zu ersehen ist, kann man die Salicylaldehyd- und Nitroprussidnatrium-Verfahren in Gegenwart von Zucker nicht anwenden. Wenn man dagegen die Kohlenhydrate nach dem Kupfer-Kalk-Verfahren von *van Slyke* vorher entfernt, so wird sich die Methode von *Straub* bewähren, wenngleich ein Verlust an Brenztraubensäure von 5 bis 8% auch so eintritt, was man in Betracht ziehen muß.

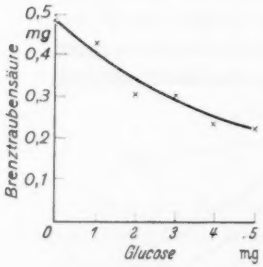

Abb. 3.

Vom theoretischen Standpunkt aus ist die Entstehung einer Brenztraubensäure-Glucose-Verbindung anzunehmen, wofür die Ergebnisse von *West* (3) gewisse Anhaltspunkte geben; er kondensierte Glucose mit Acetessigester (*West*-Zucker). Weiter gelang es *Széki* und *László* (4) andere enolisierbare Verbindungen mit Glucose zu kondensieren, jedoch ohne die Produkte isolieren zu können (absoluter Alkohol, Gegenwart von $ZnCl_2$). Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß auch unter den obengenannten Bedingungen die Glucose bzw. Fructose mit der Brenztraubensäure in Reaktion tritt.

Zusammenfassung.

Bei der Brenztraubensäure-Bestimmung in alkalischem Milieu in Gegenwart von Glucose und Fructose ist eine Abweichung von den zu erwartenden Werten zu verzeichnen, welche von der Konzentration der Glucose bzw. Fructose abhängig ist. Mithin ist Entzuckerung der Gewebsextrakte ratsam. Man kann annehmen, daß die Glucose bzw. Fructose mit der Brenztraubensäure ein Kondensationsprodukt bildet.

Literatur.

1) *F. B. Straub*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **244**, 117, 1936. — 2) *F. P. Clift* u. *R. P. Cook*, Biochem. J. **26**, 1789, 1932. — 3) *E. S. West*, J. of biol. Chem. **74**, 561, 1927. — 4) *T. Széki* u. *E. László*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **73**, 924, 1940.

Ergänzende Untersuchungen über die Wuchsstoffwirkung der Aminosäuren auf Hefe.

Von

Niels Nielsen.

(Aus dem Carlsberg-Laboratorium, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 14. November 1940.)

Bei Untersuchungen über die Wirkung von 34 Aminosäuren auf das Wachstum des in unserem Laboratorium benutzten Hefestammes (C. L. 1) zeigte sich (*Nielsen* und *Hartelius*, 1938a), daß sechs der untersuchten Aminosäuren deutlich fördernd auf das Wachstum der Hefe wirken. Dies gilt besonders für β-Alanin, das auch für andere Hefestämme als wichtiger Wuchsstoff bekannt ist (*Lash Miller*, 1936, *Williams* und *Rohrman*, 1936); wir fanden β-Alanin wirksam bei der Konzentration $1/200 \cdot 10^6$. Indessen ergab sich, daß auch fünf andere Aminosäuren das Wachstum der Hefe fördern, und zwar Lysin, Arginin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Asparagin. Diese letzteren fünf Aminosäuren müssen jedoch in wesentlich stärkerer Konzentration zugefügt werden, so daß es vielleicht zweifelhaft ist, ob sie als Wuchsstoffe aufgefaßt werden dürfen; diese Frage soll indessen später eingehender besprochen werden. Die übrigen untersuchten Aminosäuren zeigten keine sichere wachstumsfördernde Wirkung auf Hefe, auch Leucin nicht, das von *Lash Miller* (1936) als wichtiger Wuchsstoff für den von ihm benutzten Hefestamm gefunden wurde.

Die bei den genannten Untersuchungen (*Nielsen* und *Hartelius*, 1938a) festgestellte Wirkungslosigkeit der meisten Aminosäuren kann indessen auf der angewandten Methodik beruhen. Da die Aminosäuren keine Wuchsstoffwirkung ausüben, falls die Nährlösung nicht gewisse andere Wuchsstoffe enthält, wurde der Nährlösung Bierwürze zugesetzt, die mit Preßhefe ausgeschüttelt war; derartig ausgeschüttelte Bierwürze ist zwar in hohem Grade frei von Wuchsstoffen, läßt aber doch ein recht gutes Wachstum der Hefe zu. Mit dieser Methodik war es möglich, eine Wirkung der obengenannten sechs Aminosäuren festzustellen; jedoch ist möglicherweise die fehlende Wirkung der übrigen Aminosäuren darauf zurückzuführen, daß die ausgeschüttelte Würze diese Aminosäuren in ausreichender Menge enthält, so daß weiterer Zusatz keinen Ausschlag mehr gibt.

Ich habe deshalb die Versuche mit einer Nährlösung wiederholt, der keine Bierwürze zugesetzt war, sondern reine Wuchsstoffe, und zwar Biotin und Aneurin. Mit dieser Nährlösung wurden nicht nur die

früher untersuchten Aminosäuren aufs neue geprüft, sondern außerdem auch Glutamin; für viele Bakterien ist Glutamin als ein wichtiger Wuchsstoff bekannt (*Mc Ilwain*, *Fildes*, *Gladstone* und *Knight*, 1939, *Fildes* und *Gladstone*, 1939).

Versuchsergebnisse.

Zu den Versuchen wurde die früher ausführlich beschriebene Methodik (*Nielsen* und *Hartelius*, 1940) angewandt.

Die Nährlösung war folgendermaßen zusammengesetzt: 0,7 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ — 1,0 g KH_2PO_4 — 0,5 g NaCl — 0,4 g $CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$ — 0,6 g $(NH_4)_2SO_4$ — 0,5 ccm 1%ige $FeCl_3 \cdot 6\,H_2O$ — 50 g Rohrzucker pro Liter. Hierzu kam 0,1 γ Biotin [nach *Kögl* und *Tönnis* (1936) aus Eidotter hergestellt] und 0,005 Mol. Citrat, d. h. 1,05 g Citronensäure und 0,376 g NaOH (*Nielsen* und *Dagys*, 1940). Das p_H dieser Nährlösung ist etwa 4. Im übrigen wurden mit jeder Aminosäure vier Versuchsreihen angesetzt, und zwar eine Reihe ohne Zusatz weiterer Wuchsstoffe, während die anderen Reihen Zusatz von Aneurin (50 γ pro Liter) oder β-Alanin (1 mg pro Liter) oder von beiden erhielten. Die zu untersuchenden Aminosäuren wurden in Mengen von 3 mg bis 3 γ pro 50 ccm Nährlösung zugesetzt (wie in Tabelle I); nur für einige schwerlösliche Aminosäuren wurden kleinere Konzentrationen verwendet. Die Versuchsdauer betrug 24 Stunden, die Temperatur 25°.

Glutamin.

Das benutzte Glutamin wurde aus Rüben hergestellt (*Vickery*, *Pucher* und *Clark*, 1935) und durch wiederholtes Umkristallisieren gereinigt; Schmelzpunktsbestimmung (185°) und Stickstoffbestimmung ergaben Übereinstimmung mit Glutamin[1].

Tabelle I.

mg Hefetrockensubstanz pro 50 ccm.

Zugesetzte Menge Glutamin pro 50 ccm	Nährlösung mit Biotin	Nährlösung mit Biotin und Aneurin	Nährlösung mit Biotin und β-Alanin	Nährlösung mit Biotin, Aneurin und β-Alanin
3 mg	11,2	11,4	6,8	21,9
1 „	12,8	12,6	7,0	22,1
300 γ	12,6	12,8	7,2	21,9
100 γ	12,4	12,7	6,9	21,8
30 γ	12,7	12,6	7,2	22,2
10 γ	12,5	12,8	7,3	21,9
3 γ	12,7	12,5	7,1	22,1
0 γ	12,5	12,7	6,8	21,6

Die Versuche zeigen, daß Glutamin keine Wuchsstoffwirkung auf Hefe hat, jedenfalls nicht unter den hier gegebenen Bedingungen.

[1] Für Herstellung des Glutamins spreche ich Fräulein cand. polyt. *Karen Eistrup* hier meinen besten Dank aus.

Methionin.

Zu den Versuchen wurde d, l-Methionin benutzt, und zwar teils ein Präparat von *Heyl*, teils ein solches von *Merck*. Frühere Untersuchungen hatten ergeben, daß Methionin vielleicht eine Wirkung auf Hefe hat, ohne daß es indessen gelungen war, diese Wirkung mit Sicherheit festzustellen.

Tabelle II.

mg Hefetrockensubstanz pro 50 ccm.

Zugesetzte Menge Methionin pro 50 ccm	Nährlösung mit Biotin	Nährlösung mit Biotin und Aneurin	Nährlösung mit Biotin und β-Alanin	Nährlösung mit Biotin, Aneurin und β-Alanin
3 mg	9,9	17,8	9,9	33,6
1 „	11,0	17,7	11,2	34,3
300 γ	12,6	16,4	11,4	34,6
100 γ	14,2	16,8	11,0	33,7
30 γ	17,4	17,3	11,1	33,2
10 γ	17,7	17,4	10,8	32,6
3 γ	18,2	18,1	11,2	33,2
0 γ	18,5	18,5	11,0	33,8

Bei diesen Versuchen zeigt Methionin ein recht eigentümliches Verhalten. In der Versuchsreihe ohne Zusatz anderer Wuchsstoffe als Biotin wirkt Methionin stark hemmend. Schon bei Zusatz von 100 γ Methionin pro 50 ccm, d. h. also bei einer Konzentration von 1/500000, findet im Wachstum der Hefe eine Hemmung von 23 % statt, bei Zusatz der größten untersuchten Menge, 3 mg pro 50 ccm, eine Hemmung von 46 %; das Wachstum wird also ungefähr auf die Hälfte herabgesetzt.

In den Versuchsreihen mit Zusatz von Aneurin oder β-Alanin zeigt sich dagegen keine hemmende Wirkung des Methionins; nur beim stärksten Methioninzusatz findet in der Versuchsreihe mit β-Alanin eine Hemmungswirkung statt. Dies beweist also, daß die hemmende Wirkung des Methionins durch Zusatz von Aneurin oder β-Alanin aufgehoben wird. Es besteht hier eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Verhältnis zwischen Aneurin und β-Alanin: bei Zusatz von β-Alanin allein ohne Aneurin wirkt das β-Alanin hemmend (*Nielsen* und *Hartelius*, 1939); auch aus den Versuchen in Tabelle II ergibt sich diese hemmende Wirkung des β-Alanins ohne gleichzeitigen Zusatz von Aneurin deutlich beim Vergleich des Wachstums in den Kontrollkolben ohne Methioninzusatz in Versuchsreihe 1 und 2. Jedoch besteht zwischen β-Alanin und Methionin der Unterschied, daß β-Alanin bei Aneurinzufuhr fördernd wirkt, während man mit Methionin nur erreicht, daß die hemmende Wirkung aufhört.

Das hier gefundene Verhalten, daß nämlich erstens Methionin bei so schwacher Konzentration wie 1/500000 deutlich hemmend wirkt, und daß zweitens diese hemmende Wirkung durch Zusatz der Wuchsstoffe

Aneurin oder β-Alanin aufgehoben wird, weist darauf hin, daß Methionin vielleicht selbst ein Wuchsstoff ist. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß Methionin ein wichtiger Wuchsstoff für verschiedene Bakterien ist. Vielleicht ist Methionin wirksam in Verbindung mit anderen als den hier untersuchten Stoffen; es wird sich deshalb vielleicht empfehlen, bei Untersuchungen über vermutete Wuchsstoffwirkung anderer Substanzen Methionin mit in die „Grund-Wuchsstoff-Lösung" aufzunehmen.

Es ist übrigens interessant, daß die hemmende Wirkung des Methionins ebenso groß ist wie die des β-Alanins. Stellt man eine Nährlösung her, die von Wuchsstoffen nur Biotin und Methionin enthält, und fügt man zu dieser Nährlösung zunehmende Mengen von β-Alanin, so bleibt das Wachstum der Hefe während des ganzen Versuchs gleich groß (Tabelle III). Mit zunehmendem β-Alaninzusatz wird nämlich die hemmende Wirkung des Methionins aufgehoben, aber gleichzeitig tritt infolge des Mangels an Aneurin eine ebenso große hemmende Wirkung des β-Alanins ein, so daß das Wachstum der Hefe unverändert bleibt. Dies beweist also, was auch aus Tabelle II hervorgeht, daß zwar β-Alanin die hemmende Wirkung des Methionins aufheben kann, nicht aber Methionin die Hemmungswirkung des β-Alanins; Methionin kann also nicht Aneurin ersetzen..

Tabelle III.

Nährlösung mit 0,1 γ Biotin und 10 mg Methionin pro Liter.

Zugesetzte Menge β-Alanin pro 50 ccm	mg Hefetrocken-substanz pro 50 ccm	Zugesetzte Menge β-Alanin pro 50 ccm	mg Hefetrocken-substanz pro 50 ccm
30 γ	10,8	1 γ	10,5
10 γ	10,2	0,3 γ	10,3
3 γ	10,3	0 γ	10,4

Leucin.

Zu den Versuchen wurde sowohl d-Leucin wie l-Leucin benutzt. Aus diesen Versuchen, die in derselben Weise und mit den gleichen Versuchsreihen wie die oben besprochenen unternommen wurden, ergab sich, daß weder d-Leucin noch l-Leucin das Wachstum der Hefe beeinflussen. Es besteht also in dieser Hinsicht zwischen dem von *Lash Miller* und dem hier im Laboratorium benutzten Hefestamm ein deutlicher Unterschied.

Die hinsichtlich ihrer eventuellen Wirkung auf das Wachstum der Hefe untersuchten Aminosäuren sind: Glykokoll, d, l-Alanin, d, l-Serin, d, l-Amino-n-buttersäure, d, l-Amino-iso-buttersäure, d, l-Amino-n-valeriansäure, d, l-Amino-iso-valeriansäure (Valin), d, l-Amino-n-Capron-

säure, d, l-Amino-iso-capronsäure (Leucin), d, l-Amino-n-caprylsäure, d, l-Iso-leucin, Cystein, Cystin, d-Ornithin, l-Histidin, d, l-Prolin, l-Oxyprolin, l-Tyrosin, l-Tryptophan, d, l-Amino-adipinsäure, d, l-Diamino-adipinsäure, d, l-Diamino-pimelinsäure, Glutamin, d, l-Amino-α-methyl-buttersäure, Taurin, Methionin und Sarkosin. Wo es möglich war, wurden vorzugsweise die racemischen Verbindungen untersucht, da vielleicht ein Unterschied zwischen d- und l-Formen hinsichtlich ihrer wachstumsfördernden Wirkung auf Hefe besteht. Im übrigen sind die untersuchten Aminosäuren in der Hauptsache die gleichen wie die früher mit etwas anderer Methodik untersuchten (*Nielsen* und *Hartelius*, 1938a).

Die Versuchsergebnisse mit Glutamin, Leucin und Methionin wurden oben besprochen. Die übrigen Aminosäuren zeigten keine Wirkung auf das Wachstum der Hefe, so daß kein Grund vorliegt, die Versuchsergebnisse mitzuteilen.

Außer den hier genannten wurden kürzlich einige weitere Aminosäuren unter denselben Bedingungen auf ihre Wuchsstoffwirkung hin geprüft (*Nielsen*, 1940). Die betreffenden Aminosäuren sind: β-Phenyl-β-alanin, β-Amino-buttersäure, δ-Amino-valeriansäure und ε-Amino-capronsäure. Auch diese Aminosäuren haben keine wachstumsfördernde Wirkung auf Hefe, wohingegen die beiden β-Aminosäuren, wenn sie stark im Überschuß zugesetzt werden, die Wirkung des β-Alanins aufheben können.

Zusammenfassung der Versuchsergebnisse.

Die hier mitgeteilten Untersuchungen zeigen im Verein mit den früheren, daß nur eine recht geringe Anzahl von Aminosäuren das Wachstum der Hefe beeinflußt. Im ganzen wurden 32 Aminosäuren untersucht, von denen nur 7 eine Wirkung auf das Wachstum des hier benutzten Hefestammes haben; diese 7 Aminosäuren sind: β-Alanin, Lysin, Arginin, Methionin, Asparaginsäure, Asparagin und Glutaminsäure.

Die Konzentrationen, in denen die verschiedenen Aminosäuren wirken, sind recht verschieden. β-Alanin ist wirksam in der Konzentration 10^{-9} (*Nielsen* und *Dagys*, 1940); dagegen mußten von den übrigen Aminosäuren weit größere Mengen angewendet werden. Methionin erfordert ein Verhältnis von 1/500000 und Lysin von 1/40000, während von Asparagin, Asparaginsäure und Glutaminsäure noch mehr nötig ist. Diese starken Konzentrationen machen es vielleicht schwierig, die betreffenden Aminosäuren als Wuchsstoffe zu betrachten; jedenfalls muß man stets damit rechnen, daß die Wirkung möglicherweise auf Verunreinigungen beruht, eine Gefahr, die selbstverständlich um so größer wird, je stärker die notwendige Konzentration ist. Für das β-Alanin ist also diese

Wahrscheinlichkeit recht gering; im übrigen haben *Nielsen* und *Hartelius* (1938b) nachgewiesen, daß ein durch Hydrolyse aus dem unwirksamen β-Alanyl-glycin hergestelltes β-Alanin ebenso wirksam ist wie gewöhnliches β-Alanin; auch das aus der unwirksamen β-Oxy-propionsäure hergestellte β-Alanin hat dieselbe Wirkung, die daher zweifellos der Aminosäure selbst und nicht irgendeiner Verunreinigung zuzuschreiben ist. Hinsichtlich der Asparaginsäure haben *Nielsen* und *Hartelius* (1938b) gleichfalls nachgewiesen, daß die unwirksame Glycyl-asparaginsäure nach Hydrolyse wirksam wird; über andere Aminosäuren liegen derartige Untersuchungen nicht vor. Da nur eine sehr geringe Verunreinigung durch eine hochaktive Substanz dazu gehört, um eine Wirkung hervorzubringen, so dürfte Reinigung durch Umkristallisation kaum ausreichend sein; am besten ist zweifellos Darstellung der betreffenden Aminosäuren aus Stoffen, die selbst unwirksam sind, so wie es für β-Alanin und Asparaginsäure durchgeführt wurde.

Eine Beurteilung der Stellung, die die Aminosäuren als Wuchsstoffe einnehmen, bietet beträchtliche Schwierigkeiten. Diese Frage wurde kürzlich von *Schopfer* (1939) behandelt, der Nährstoffe, Nährstoffe mit spezifischer Wirkung, stimulierende Faktoren und Wachstumsfaktoren unterscheidet. Wenn auch eine derartige Einteilung vielleicht theoretisch richtig sein mag, so ist ihre Durchführung hinsichtlich der Aminosäuren wohl kaum möglich, da unsere Kenntnisse in bezug auf die Wirkung dieser Stoffe zur Zeit allzu gering sind. Da man β-Alanin und Lysin überhaupt nicht als Stickstoffquellen für Hefe benutzen kann (*Nielsen*, 1936) und Glutaminsäure jedenfalls nicht unter den angewandten Versuchsbedingungen (*Hartelius*, 1939), so meint *Schopfer*, daß diese Stoffe als stimulierende Faktoren zu betrachten sind. Dies ist indessen keineswegs sicher. Obwohl die betreffenden Stoffe nicht als einzige Stickstoffquelle für Hefe dienen können und auch nicht in analytisch nachweisbarer Menge aufgenommen werden, so ist es doch sehr wohl möglich, daß sie zum Aufbau gewisser besonderer Eiweißstoffe Verwendung finden. In diesem Falle sind sie wohl als Nährstoffe mit spezifischer Wirkung aufzufassen.

Auch die Wirkung von Asparagin und Asparaginsäure ist unsicher: *Schopfer* meint, daß die Bedeutung dieser Aminosäuren darin liegt, daß sie besonders gute Stickstoffquellen für Hefe sind. Spätere Untersuchungen haben indessen gezeigt, daß Asparagin und Asparaginsäure durch Glutaminsäure (*Nielsen* und *Hartelius*, 1939) oder Citronensäure (*Nielsen* und *Dagys*, 1940) ersetzt werden können; ihre Wirkung kann also nicht ausschließlich darauf beruhen, daß sie besonders gute Stickstoffquellen sind.

Aus diesen Gründen halte ich es deshalb für das beste, die Aminosäuren vorläufig nur als Wuchsstoffe zu bezeichnen. Ein Teil von ihnen

ist allerdings nur in sehr starker Konzentration wirksam; aber dies gilt ja z. B. auch für Inosit, das trotzdem allgemein als Wuchsstoff bezeichnet wird.

Literatur.

P. Fildes u. *G. P. Gladstone*, Brit. J. exp. Path. **20**, 334, 1939. — *V. Hartelius*, diese Zeitschr. **299**, 317, 1939; C. r. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **22**, 303, 1939. — *F. Kögl* u. *B. Tönnis*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **242**, 43, 1936. — *H. Mc Ilwain*, *P. Fildes*, *G. P. Gladstone* u. *B. C. G. J. Knight*, Biochem. J. **33**, 223, 1939. — *W. Lash Miller*, Transact. R. Soc. Canada, Ser. III, Sect. 3, **30**, 99, 1936. — *N. Nielsen*, C. r. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **21**, 395, 1936. — *Derselbe*, ebenda **23**, 107, 1940. — *N. Nielsen* u. *J. Dagys*, ebenda **22**, 447, 1940. — *N. Nielsen* u. *V. Hartelius*, diese Zeitschr. **295**, 211, 1938a; C. r. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **22**, 249, 1938a. — *Dieselben*, diese Zeitschr. **296**, 359, 1938b; C. r. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **22**, 271, 1938b. — *Dieselben*, diese Zeitschr. **301**, 125, 1939; C. r. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **22**, 375, 1939. — *W. H. Schopfer*, Ergebn. d. Biol. **16**, 1, 1939. — *H. B. Vickery*, *G. W. Pucher* u. *H. E. Clark*, J. of biol. Chem. **109**, 39, 1935. — *R. J. Williams* u. *E. Rohrman*, J. Amer. Chem. Soc. **58**, 695, 1936.

Die reversible Umwandlung von Myoglobin in Cytochrom.

Von

Eduard Bechtold und **Karl Pfeilsticker.**

(Aus der Gewerblichen Berufsschule im Hoppenlau, Stuttgart, und dem Chemischen Untersuchungsamt der Stadt Stuttgart*.)

(Eingegangen am 21. November 1940.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

I. Frühere Versuchsergebnisse von Bechtold.

Myoglobin und Cytochrom werden auf Grund der Angaben von *Keilin* und *Theorell* allgemein als zwei durchaus voneinander verschiedene Farbstoffe angesehen. Demgegenüber hat *E. Bechtold* 1934 gezeigt (1), daß Myoglobin leicht in Cytochrom umgewandelt werden kann. Das so gewonnene Cytochrom kann ebenso leicht wieder in Myoglobin zurückverwandelt werden.

Die Angaben von *Bechtold* stützen sich u. a. auf folgende Versuche:

1. Gibt man zu einer wässerigen Myoglobinlösung Hydrazinhydrat, so tritt das charakteristische *bcd*-Cytochromspektrum auf. (b = 565 mμ, c = 552 mμ, d = 525 bis 535 mμ.)

2. Schüttelt man die Lösung, die das Cytochromspektrum zeigt, mit Luft, so erscheint das zweibandige Spektrum des Oxymyoglobins (erster Streifen bei 582 mμ). Beim Stehen treten nach kurzer Zeit die Cytochromabsorptionsstreifen wieder auf.

3. Die gleichen Erscheinungen lassen sich an myoglobinhaltigem rotem Muskelfleisch nachweisen. Betupft man z. B. eine etwa $^1/_2$ mm starke Scheibe Rindfleisch mit Hydrazinhydrat, so sieht man nach kurzer Zeit ebenfalls das Cytochromspektrum.

4. Verwendet man statt gewöhnlichem Muskelfleisch Herzmuskel, so tritt mit Hydrazinhydrat ebenfalls ein Cytochromspektrum auf, das aber außer den *bcd*-Absorptionen noch den a-Streifen bei 605 mμ zeigt.

Bechtold hat eingehend nachgewiesen, daß sich Cytochrom von Myoglobin herleitet.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung ist Cytochrom ein Myoglobin, das mit einer besonderen stickstoffhaltigen Substanz verbunden und dadurch in Cytochrom umgewandelt ist. Auf die naheliegende Frage, warum sich natürlich vorgebildetes Cyto-

* Vorliegende Untersuchung wurde mit der spektrographischen Einrichtung des Chemischen Untersuchungsamtes der Stadt Stuttgart durchgeführt. Herrn Direktor *H. Jesser* möchten wir auch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank für die Förderung der Arbeit aussprechen.

chrom, z. B. in Hefe, nicht in Myoglobin umwandeln läßt, wird in einem späteren Abschnitt eingegangen werden.

Gegen die Beweisführung *Bechtolds* wurde eingewandt, daß die von ihm erwähnten Versuche nicht an reinem Myoglobin, sondern an Farbstofflösungen angestellt seien, die durch bloßes Ausziehen des Myoglobins mit Wasser dargestellt waren und außer Myoglobin noch andere Bestandteile des Muskels enthielten.

Wir haben nunmehr Myoglobin nach der Methode von *Theorell* rein dargestellt. Auch reines Myoglobin kann leicht in Cytochrom umgewandelt werden in gleicher Weise wie Myoglobin, das sich in wässerigen Muskelauszügen befindet. Von diesem aus Myoglobin dargestellten Cytochrom konnte *Bechtold* bisher nur subjektiv festgestellte Werte für die Lage der Absorptionsmaxima angeben. Wir haben jetzt die Absorptionskurve aufgenommen. Weiter haben wir uns mit der physiologischen Bedeutung dieser Umwandlung beschäftigt und in diesem Zusammenhang auch Redoxpotentiale gemessen.

II. Die Umwandlung des reinen Myoglobins durch Hydrazinhydrat.

Die Reindarstellung des Rindermyoglobins gelang gut nach den Angaben von *Theorell* (2). Wir erhielten den Farbstoff fast vollständig als Metamyoglobin. Das Umkristallisieren und Dialysieren erfolgte dreimal, wobei je vier- bis fünfmal mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen wurde. Über die Entfernung des Ammonsulfats finden sich bei *Theorell* keine näheren Angaben. Wir saugten nach der letzten Dialyse den Farbstoff mit einem Filterstäbchen oder auf der Nutsche ab und trockneten ihn anschließend zwischen Filtrierpapier. Das so hergestellte Myoglobin enthält noch etwas Ammonsulfat.

Das Wiederauflösen darf nicht mit kohlensäurehaltigem destilliertem Wasser erfolgen, sondern nur mit Pufferlösung, deren p_H nicht unter 7 liegt. Beim p_H des gewöhnlichen destillierten Wassers wird ein großer Teil des Myoglobins denaturiert und koaguliert, besonders auch, weil das anwesende Ammonsulfat ansäuernd wirkt. Getrocknetes Myoglobin ist immer zum Teil denaturiert. Diese Denaturierung, die beim Aufbewahren anscheinend fortschreitet, gibt sich dadurch zu erkennen, daß sich das Myoglobin nicht mehr vollständig löst. Gut ist, wie auch *Theorell* gelegentlich angibt, die Aufbewahrung unter gesättigter Ammonsulfatlösung.

Abb. 1 zeigt die Umwandlung von reinem Oxymyoglobin in Cytochrom. In gleicher Weise reagiert Metamyoglobin. Der Oxymyoglobinstreifen bei 582 mμ tritt in der Abbildung (1. Aufnahme) stark hervor. Auf Zugabe von viel Hydrazinhydrat erscheint das darunter wiedergegebene Cytochromspektrum mit seinen charakteristischen

Streifen $b = 565\ m\mu$ und $c = 552\ m\mu$. Der d-Streifen bei 525 bis 535 $m\mu$ ist deutlich in seine beiden Komponenten x und y gespalten. Schüttelt man die in Cytochrom umgewandelte Lösung genügend stark mit Luft, so tritt wieder das ursprüngliche Oxymyoglobinspektrum auf (4. Aufnahme). Bei schwächerem Schütteln ergibt sich ein Zwischenzustand (3. Aufnahme), bei dem gleichzeitig der b-Streifen des Cyto-

1. Abb. 1. Reversible Umwandlung von reinem Oxymyoglobin in Cytochrom.
2. 1. Oxymyoglobin.
2. Cytochrom aus 1. (+ Pyridin + Na-Hydrosulfit).
3. 3. Teilweise zurückverwandelt (Schütteln mit Luft).
4. 4. Ganz in Oxymyoglobin zurückverwandelt (stärkeres Schütteln mit Luft).

chroms und der Oxymyoglobinstreifen bei 582 $m\mu$ zu erkennen sind. Oft kann man die Zunahme des einen Streifens auf Kosten des anderen sehr schön im Handspektroskop verfolgen. Beim Stehen solcher Lösungen im Reagensglas tritt oft auch der Zustand ein, daß in der oberen Schicht näher der Luft das Oxymyoglobinspektrum vorherrscht, während weiter unten reines Cytochrom zu sehen ist. Diese Übergangszustände lassen sich allerdings nicht so gut mit Hydrazinhydrat beobachten wie mit dem später beschriebenen Umwandlungsreagens.

III. Lage und Intensität der Absorptionsmaxima des Myoglobin-Cytochroms im Vergleich mit natürlich vorgebildetem Cytochrom.

Die Absorptionskurve des Myoglobin-Cytochroms (Abb. 2) weist verschiedene Maxima auf, die bei 565, 552, 535, 525 und bei 423 $m\mu$ liegen. Ein weiteres Maximum ist bei 400 $m\mu$ angedeutet. Die ersten vier Streifen sieht man auch im zweiten Spektrum von Abb. 1 sowie in Abb. 3. Es sind die von *Keilin* beschriebenen typischen Cytochromabsorptionen. Sie werden von ihm der Reihenfolge nach mit b, c, x und y bezeichnet. Nach seinen subjektiven Lagemessungen gibt *Keilin* (3) für b 564,5 $m\mu$ (Bäckerhefe) bis 566,5 $m\mu$ (Bienenflügelmuskel) an. Für die c-Absorption liegen seine Werte bei 549 bis 550,2 $m\mu$, für x bei 532 $m\mu$ und für y bei 521 $m\mu$. Die Absorptionsstreifen des Myoglobin-Cytochroms sind also ein wenig, 2 bis 4 $m\mu$, nach Rot verschoben. Dieser Unterschied ist nicht größer als die von *Keilin* angegebenen Schwankungen innerhalb der natürlich vorgebildeteten Cytochromarten.

In Abb. 3 werden die Spektren verschiedener Cytochromarten miteinander verglichen. Die Spektren 1 und 2 bringen das natürlich

vorgebildete Cytochrom von Hefe und Insektenbrustmuskel. Zur Aufnahme wurden diese einfach zwischen zwei Objektträgern breitgedrückt. Leider stand uns hierfür kein Mikrogerät zur Verfügung. Daher werden die Cytochromabsorptionen von Licht überlagert, das durch andere Zellbestandteile oder auch neben den Zellen hindurchging. Trotzdem kann man die Cytochromstreifen noch ganz deutlich erkennen. Infolge

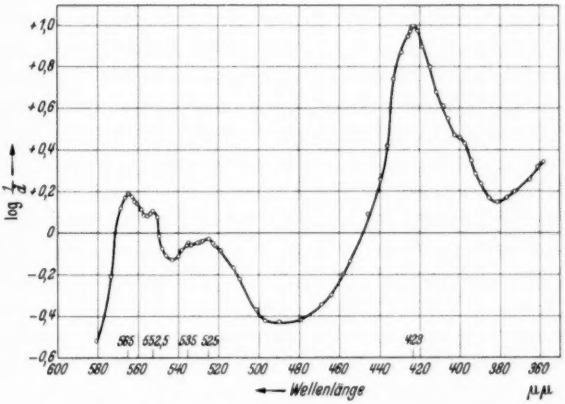

Abb. 2. Myoglobin-Cytochrom. Absorptionskurve.

der Schwierigkeiten bei Aufnahmen dieser Art sieht man in Veröffentlichungen das Cytochromspektrum nur gezeichnet und nicht photographiert.

Bei den letzten drei Spektren der Abb. 3 handelt es sich um Myoglobin-Cytochrom. Große Ähnlichkeit mit den beiden natürlich vor-

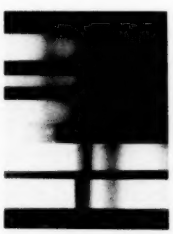

Abb. 3. Vergleich verschiedener nativer und aus Myoglobin dargestellter Cytochromarten.
1. Hefe (nativ).
2. Insekt, Brustmuskulatur (nativ).
3. Herz (+ Hydrazinhydrat).
4. Pathologischer Muskel (+ Hydrazinhydrat).
5. Normaler Muskel (+ Hydrazinhydrat).

gebildeten Cytochromen zeigt das erste Spektrum dieser Reihe (Nr. 3 der Abbildung). Die Ähnlichkeit ist trotz der starken Verwaschenheit des Spektrums noch deutlich zu erkennen. Die Aufnahme wurde mit einer dünnen Scheibe Kalbsherzmuskulatur erhalten, welche mit etwas Hydrazinhydrat versetzt und zwischen zwei Objektträgern breitgedrückt wurde. Hier ist übereinstimmend mit den beiden ersten

Spektren auch der von *Keilin* mit *a* bezeichnete Streifen bei 605 mμ angedeutet. Demgegenüber besitzt Myoglobin-Cytochrom aus gewöhnlichen Muskeln keinen *a*-Streifen.

Myoglobin-Cytochrom aus gewöhnlichen Muskeln ergibt ein Spektrum, wie es die letzte Aufnahme von Abb. 3 zeigt. Das gilt gleichermaßen, ob es sich um eine dünne Scheibe Muskelfleisch handelt und das Myoglobin sich noch in den Zellen befindet, ob Auszüge aus Muskeln untersucht werden oder ob man von rein dargestelltem Myoglobin ausgeht. Im Gegensatz zu den ersten Spektren ist hier der *b*-Streifen stärker als *c*. Wird jedoch reines Myoglobin längere Zeit aufbewahrt, so wird die Intensität der beiden Streifen einander ziemlich gleich. Für die in Abb. 1 gezeigte Umwandlung wurde z. B. ein Myoglobinpräparat verwendet, das schon 1 Jahr gelagert hatte*. Hier zeigt das Cytochromspektrum die Streifen *b* und *c* fast gleich stark. Ein Myoglobin-Cytochrom, in dem der *c*-Streifen überwiegt, ähnlich wie bei natürlich vorgebildetem Cytochrom, bringt die 4. Aufnahme von Abb. 3. Es ist bemerkenswert, daß es sich dabei um einen pathologischen Fall handelt. Die Farbstofflösung wurde aus Muskulatur von einem Pferd erhalten, das wegen Kreuzrehe geschlachtet wurde. Die Kreuzrehe führt regelmäßig zu Myoglobinurie. Wird dieser Muskelauszug mit Hydrazinhydrat versetzt, so tritt das abgebildete Cytochromspektrum auf. Das Verhältnis der Intensitäten von *b* und *c* ist also wechselnd, wie auch *Keilin* schon für verschiedene Cytochromarten angibt. Doch hat er nie beobachtet, daß *b* stärker als *c* erscheint.

In Übereinstimmung mit *Keilin* finden wir auch bei Myoglobin-Cytochrom für die violettwärts gelegene Bande *y* in der *d*-Absorption eine größere Intensität als für *x*. Wie aus der Absorptionskurve hervorgeht, besitzt Myoglobin-Cytochrom weiterhin eine sehr starke Absorption zwischen 440 und 390 mμ mit dem Gipfel bei 423 mμ. Ein weiteres Maximum ist bei 400 mμ angedeutet. Cytochrom von Bienenbrustmuskeln hat nach *Warburg* und *Negelein* (4) im Blau und Violett Banden bei 446 bis 452 mμ, bei 430 bis 435 mμ und bei 413 bis 420 mμ. Von diesen drei Banden ist die erste schwächer als die zweite und dritte. Die von uns gefundene Absorption im Blau überdeckt etwa den Bereich dieser drei Banden mit einer kleinen Verschiebung gegen kürzere Wellen. Im UV finden wir eine bei 295 mμ beginnende starke Absorption. Sie ist in der Kurve nicht mehr enthalten.

Für die Absorptionskurve des Myoglobin-Cytochroms wurden 68 Werte des Extinktionskoeffizienten bestimmt. Die Aufnahme selbst erfolgte in bekannter Weise mit Hilfe des *Hüfner*-Prismas und des Küvettensatzes nach *Scheibe* mit dem Glasspektrographen „Glas 12" von

* Durch äußere Gründe bedingt.

Zeiss. Jede Küvette wurde nach der Füllung so lange stehengelassen bis anzunehmen war, daß sich der endgültige Farbstoffzustand eingestellt hatte. Während des Umschüttens der Lösung wird nämlich wie beim Schütteln mit Luft die eingangs erwähnte Umwandlung in Oxymyoglobin erzeugt. Als Lichtquelle diente uns der sehr lichtstarke Abreißbogen mit Hochfrequenzzündung nach *Pfeilsticker* (5), den wir zwischen Wolframelektroden übergehen ließen. Der rotierende Sektor schwächte das Licht der einen durch das *Hüfner*-Prisma erzeugten Spektrenhälfte auf $^1/_5$. Die Spaltöffnung betrug 0,03 mm.

Die Stelle der Schwärzungsgleichheit in der oberen und unteren Spektrenhälfte wurde mit Hilfe des Spektrallinienphotometers bestimmt*. Gegenüber der subjektiven Auswertung hat diese objektive Methode auch den Vorzug, daß sie für beliebig viele Stellen der Wellenlängenskala Messungen erlaubt, ohne daß man von der Anzahl der Küvetten abhängig ist. Dadurch können auch feinere Einzelheiten der Extinktionskurve erfaßt werden. In jeder Spektrenhälfte wird die Schwärzung der Wolframlinien oder des Untergrundes je einige Schichtdicken vor und nach der Schwärzungsgleichheit gemessen. Das Verhältnis der Galvanometerausschläge in beiden Spektrenhälften wird auf einfach logarithmischem Papier gegen die Schichtdicke aufgetragen. Für die Galvanometerausschläge wird die logarithmische Teilung, für die Schichtdicke die Millimetereinteilung benutzt. Für jede Wellenlänge läßt sich aus der Verbindungslinie der zugehörigen Punkte, die im geradlinigen Teil der photographischen Schwärzungskurve annähernd eine Gerade ist, die Schichtdicke ablesen, bei der Schwärzungsgleichheit vorhanden ist. Diese Schichtdicke ist dem Extinktionskoeffizienten umgekehrt proportional. Der Einfachheit halber ist in Abb. 2 der Logarithmus der reziproken Schichtdicke angegeben.

IV. Die Umwandlung mit Hilfe von Pyridin.

Die Wirkung des Hydrazinhydrats bei der Umwandlung von Myoglobin in Cytochrom kann auf drei Eigenschaften beruhen: auf seiner Alkalität, seiner Reduktionskraft und auf einer spezifischen Wirkung. Eine spezifische Wirkung muß vorliegen, da andere alkalische Reduktionsmittel aus Oxymyoglobin nur reduziertes Myoglobin entstehen lassen. Wir prüften daher, ob andere N-Verbindungen das Hydrazinhydrat in seiner spezifischen Wirkung ersetzen können. Eine solche N-Verbindung fanden wir im Pyridin. Pyridin wandelt ebenso wie Hydrazinhydrat Myoglobin in Cytochrom um, und zwar mit größter Leichtigkeit. Zur Umwandlung genügt schon eine viel kleinere Menge

* Wir folgten dabei einem Hinweis, den wir Herrn Dr. *Ramb* von der Firma *C. Zeiss*, Jena, verdanken.

als von Hydrazinhydrat. Auch mit Piperidin hatten wir zunächst scheinbar Erfolg, der sich aber auf einen Gehalt an Pyridin in unserem Präparat zurückführen ließ. Reines Piperidin gibt keine Umwandlung. Der p_H-Bereich der Umwandlung ist bei Pyridin größer als bei Hydrazinhydrat. Während dieses bei p_H 7 kaum noch wirksam ist, gelingt die Umwandlung mit Pyridin auch noch etwas unter p_H 7. Unsere Versuche führten wir gewöhnlich in Phosphatpuffer von p_H 7,4 durch. Zur Darstellung von reduziertem Cytochrom erfordert Pyridin selbstverständlich noch ein besonderes Reduktionsmittel. Wir verwendeten Natriumhydrosulfit.

Mit Pyridin werden besonders scharfe Spektren von reduziertem Cytochrom erhalten. Sie unterscheiden sich nicht von den Spektren mit Hydrazinhydrat. Für 2 ccm 0,5%iger Myoglobinlösung genügen 0,1 ccm 10%iges Pyridin vollkommen. Viel Pyridin denaturiert den Farbstoff, wie später ausgeführt wird. Die Klarheit des mit Pyridin erhaltenen Spektrums beruht darauf, daß die Umwandlung mit Pyridin leicht vollständig gemacht werden kann, so daß kein reduziertes Myoglobin zurückbleibt. Reduziertes Myoglobin stört durch seine breiten verwaschenen Banden, die einen unerwünschten Untergrund zu den schmalen scharfen Cytochromstreifen liefern.

Die Umwandlung mit Pyridin erfolgt unabhängig von der Reihenfolge der Zugabe des Pyridins und des Reduktionsmittels. Auch auf die dreiwertige Stufe, Metamyoglobin, wirkt Pyridin ein. Metamyoglobin zeigt in Phosphatpuffer von p_H 7,4 den charakteristischen Streifen des „sauren" Metamyoglobins bei 630 mμ. Dieser Streifen verschwindet auf Zugabe von Pyridin. Das Reaktionsprodukt kann im Handspektroskop nicht erkannt werden, da es nur eine sehr undeutliche Absorption besitzt, die bei 530 bis 550 mμ liegt. Man muß annehmen, daß es sich hier um Cytochrom in der oxydierten Stufe handelt. Auf Zugabe von Reduktionsmittel erscheint sofort das reduzierte Cytochrom. Oxymyoglobin verändert sich selbstverständlich mit Pyridin nicht, da Myoglobin-Cytochrom durch Sauerstoff umgekehrt in Oxymyoglobin übergeführt wird. Erst wenn der Sauerstoff durch ein Reduktionsmittel weggenommen wird, erscheint wie erwähnt das Cytochrom. So erfolgte die Umwandlung in Abb. 1 mit Pyridin und Reduktionsmittel. Dadurch, daß das Reduktionsmittel von der N-Verbindung getrennt ist, hat man seine Dosierung in der Hand. Auf diese Weise können Zwischenstufen der Umwandlung, wie in der 3. Aufnahme von Abb. 1, viel leichter festgehalten werden.

Durch Kohlenoxyd wird Myoglobin-Cytochrom in CO-Myoglobin übergeführt, gleichgültig, ob es mit Hydrazinhydrat oder mit Pyridin hergestellt wurde. Blausäure verhindert die Entstehung des Myoglobin-Cytochroms nicht, im Falle von Hydrazinhydrat allerdings nur dann,

wenn viel Hydrazinhydrat anwesend ist. Auch bei Anwesenheit von Blausäure entsteht aus reduziertem Cytochrom durch Schütteln mit Luft Oxymyoglobin.

Die Bedeutung des Pyridins für Hämine ist bekannt. Als Nicotinsäureamid ist der Pyridinkern Bestandteil von Co-Fermenten, die Zwischenglieder der Atmung sind. Wir haben daher auch diese Verbindung geprüft und gefunden, daß Myoglobin durch Nicotinsäureamid und Reduktionsmittel in reduziertes Cytochrom umgewandelt wird, allerdings bedeutend langsamer als durch Pyridin. Die Absorptionsstreifen sind in beiden Fällen gleich.

Wenn auch Nicotinsäureamid, das Antipellagravitamin, ein natürlich vorkommender lebenswichtiger Bestandteil aller Zellen ist, wollen wir doch nicht sagen, daß es die N-Verbindung der natürlich vorgebildeten Cytochromarten sein muß. Aus unseren Versuchen schließen wir nur, daß natives Cytochrom ein Myoglobin ist, gebunden an eine N-Verbindung von der Wirkung des Pyridins. Manche Eigenschaften des Myoglobin-Cytochroms deuten im Gegenteil darauf hin, daß in natürlich vorgebildetem Cytochrom, z. B. von Hefe, eine andere N-Verbindung die umwandelnde Wirkung ausübt als z. B. Nicotinsäureamid. In diesem Zusammenhang ist vor allem der Umstand anzuführen, daß *b c*-Cytochrom nicht auszulösen ist, wie von *Mac Munn*, *Keilin* und *Bechtold* betont wird. Die N-Verbindung ist wohl fester mit dem Myoglobin verbunden als Pyridin. Aus diesem Grunde ist vermutlich Hefe- und Insektencytochrom nicht in Oxymyoglobin verwandelbar. Ein Cytochrom, das aus Myoglobin und Pyridin besteht, würde nach unseren Versuchen durch Sauerstoff in Oxymyoglobin umgewandelt werden.

Der Pyridinkern kann in den natürlich vorgebildeten Cytochromen auch durch eine besondere Gruppe fester an die Myoglobinkomponente gebunden sein, ähnlich wie es z. B. von Lactoflavin und seinem Eiweiß bekannt ist *.

Bei der ganzen Frage muß man im Auge behalten, daß jedes Cytochrom seine besondere Wirkung wahrscheinlich gerade dadurch entfaltet, daß sich molekularer Sauerstoff an die reduzierte Stufe anlagert, sei es mit oder ohne Abspaltung der N-Verbindung. Das O_2-Anlagerungsprodukt könnte in so geringer Menge vorliegen, daß sein Spektrum nicht sichtbar ist. Das reduzierte Cytochrom könnte trotzdem erkannt werden, weil die Intensität des Cytochromspektrums größer ist als die Stärke der Oxymyoglobinabsorptionen.

* Umwandlungsversuche mit den Pyridinabkömmlingen Cozymase und Codehydrase II konnten wir bisher noch nicht durchführen.

Wir haben noch verschiedene andere N-Verbindungen auf ihre Fähigkeit geprüft, Myoglobin in Cytochrom umzuwandeln, so Adenosintriphosphorsäure*, Muskeladenylsäure*, Hefenucleinsäure, Histidin, Lactoflavin, Vitamin B_1 und andere, alle mit negativem Erfolg.

Es liegt nahe zu versuchen, aus Myoglobin-Cytochromlösung festes Cytochrom darzustellen, etwa durch Aussalzen mit Ammonsulfat. Bei solchen Versuchen erhielten wir regelmäßig statt des erwarteten Cytochroms ein Myochromogen, also ein Denaturierungsprodukt.

V. Myochromogen und seine Veränderung durch Hydrazinhydrat.

Wird zur Umwandlung von Myoglobin in Cytochrom zu viel Pyridin angewandt, so wird das Myoglobin denaturiert. Es entsteht dann kein Cytochrom, sondern Myochromogen**, das eine charakteristische Absorption bei 556 mμ besitzt, also zwischen den Cytochromstreifen *b* und *c*. Gleichzeitig flockt ein großer Teil des Farbstoffs aus.

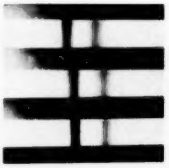

Abb. 4. Wanderung der Myochromogenabsorptionen beim Stehen in Hydrazinhydratlösung.
Myochromogen, denaturiertes Myoglobin in Hydrazinhydrat gelöst:
1. Sofort nach Lösung.
2. Nach 48 Stunden.
3. Nach 72 Stunden.

Ebenso verhält sich jedes Myoglobin, wenn es durch irgendeine andere Einwirkung denaturiert ist, sei es durch Säure (p_H kleiner als 5) oder durch längeres Lagern oder auf eine andere Art. Das denaturierte Myoglobin ist in Wasser fast unlöslich, löst sich aber verhältnismäßig leicht in ziemlich konzentriertem Hydrazinhydrat und zeigt dann ein ausgeprägtes Myochromogenspektrum mit dem Streifen bei 556 mμ. Zum Unterschied von Myoglobin-Cytochrom kann Myochromogen nicht mehr in Oxymyoglobin zurückverwandelt werden.

Die Lösung von denaturiertem Myoglobin (Myochromogen) in Hydrazinhydrat erfährt dagegen bei längerem Stehen eine Veränderung anderer Art. Sie nimmt nach einigen Tagen einen mehr violettroten Ton an und weist dann einen scharfen Streifen bei 546 mμ auf. Diese Wanderung der Absorption nach kürzeren Wellen um etwa 10 mμ, die sich in 3 Tagen vollzieht, ist in Abb. 4 deutlich zu erkennen. Auch diese Lösung kann ebenso wie Myochromogen nicht mehr in Oxymyoglobin zurückverwandelt werden.

* Der Fa. Dr. *G. Henning*, Chem. Pharm. Werk G. m. b. H., Berlin-Tempelhof, sind wir für die Überlassung von Adenosintriphosphorsäure und Muskeladenylsäure zu Dank verpflichtet. — ** Nach Zugabe von Reduktionsmittel.

Der Absorptionsstreifen der neu entstandenen Lösung liegt ziemlich genau an der Stelle der Bande des Cytochroms *c*, auch die Farbe ist cytochromähnlich. Wir vermuten daher, daß *Keilin* sowohl wie *Theorell* eine derartige Substanz als rein dargestelltes Cytochrom *c* beschrieben haben. Eine Behandlung wie z. B. mit $^1/_{10}$ n-Schwefelsäure hat denaturierende Wirkung. Der so gewonnene Farbstoff ist nicht mehr nativ. Es ist daher nicht verwunderlich, daß er nicht in Oxymyoglobin zu verwandeln ist, ebensowenig wie Myochromogen und sein eben erwähntes Umwandlungsprodukt, das in Hydrazinhydratlösung entsteht. Eine Umwandlung durch Sauerstoff zu Oxymyoglobin kann man nur von einem Cytochrom erwarten, das noch nativ ist. Myoglobin-Cytochrom besitzt noch die native Globinkomponente, wie daraus hervorgeht, daß es sich in Oxymyoglobin zurückverwandeln läßt. Oxymyoglobin hat stets natives Globin zur Voraussetzung. Diesen Schluß darf man in Analogie zu Oxyhämoglobin ziehen, für das der entsprechende Nachweis erbracht ist (6). Weil die von *Keilin* und von *Theorell* erhaltene Substanz ein Denaturierungsprodukt darstellt, weist sie auch nicht das vollständige *b c*-Cytochromspektrum auf, sondern nur den Streifen *c*. Dieser Streifen ist nicht die Absorption eines Cytochroms, sondern eines Myochromogens, d. h. eines denaturierten Farbstoffs.

VI. Redoxpotentiale in Myoglobin-Cytochromlösungen und die Geschwindigkeit der Sauerstoffübertragung.

Die bisherigen Ausführungen stellen das Cytochrom dar als ein natives Myoglobin, verbunden mit einer besonderen stickstoffhaltigen Substanz, die mehr oder weniger fest gebunden sein kann. Wir legten uns weiter die Frage vor, welche Änderungen, abgesehen von den verschiedenen Spektren, durch die N-Verbindung bewirkt werden. Dazu haben wir das Redoxpotential von Myoglobinlösungen und von Myoglobin-Cytochrom (= Myoglobin + Pyridin) gemessen. Dabei ergaben sich bemerkenswerte Beobachtungen über die verschiedene Geschwindigkeit der Sauerstoffabsorption.

Die Messungen erfolgten im Stickstoffstrom, der gleichzeitig die Durchmischung besorgte, mit blanker Platinelektrode bei p_H 7,4. Gegen das starke Schäumen der Myoglobinlösungen wurde ein Tropfen Octylalkohol zugesetzt. Reines Metamyoglobin wurde in Phosphatpuffer gelöst (0,2 %), zur Cytochromherstellung wurde verdünntes Pyridin (1 : 10) zugegeben, bis seine Konzentration 0,2 % betrug. Aus einer Mikrobürette wurde mit 1 %igem Natriumhydrosulfit in Phosphatpuffer titriert. Während der Messungen konnte das Spektrum der Lösung mit einem Handspektroskop beobachtet werden.

Myoglobin/Metamyoglobin hat bei p_H 7,4 ein Redoxpotential $E_0 = -0{,}08$ Volt. Es ist negativer als das Redoxpotential Hämoglobin/Methämoglobin, das zu $+0{,}152$ Volt bei p_H 7,0 angegeben

wird (7). Im Einklang damit wird Oxymyoglobin beim Liegen an der Luft viel schneller zu Metamyoglobin oxydiert als Oxyhämoglobin zu Methämoglobin.

Gibt man zu Myoglobin Pyridin, so erhält man das Redoxpotential von Myoglobin-Cytochrom. Diese Messung bietet eine gewisse Schwierigkeit, weil das Potential gegen Spuren von Sauerstoff außerordentlich empfindlich ist. Der wahrscheinlichste Wert von E_0 (p_H 7,4) liegt zwischen + 0,03 und + 0,08 Volt. Das Potential ist unter dem Einfluß des Pyridins positiver geworden. Etwas Ähnliches wurde schon früher für Hämin und Hämin + Pyridin festgestellt (8). Die Verschiebung ist dort etwas größer. Zum Vergleich sei noch das Redoxpotential von „Cytochrom *c*" nach *Keilin* angegeben, das bei p_H 7,0 + 0,123 Volt beträgt (9). In Übereinstimmung mit den Redoxpotentialen wird Metamyoglobin allein durch halbreduziertes Methylenblau in Oxymyoglobin übergeführt, in Gegenwart von Pyridin dagegen in reduziertes Cytochrom. Beide Reaktionen erfordern einige Zeit.

Viel größere Unterschiede zwischen Myoglobin und Myoglobin-Cytochrom zeigen sich, wenn Sauerstoff zutreten kann. Sie drücken sich aus im Gang des Redoxpotentials und in der Geschwindigkeit der Anlagerung und des Verbrauchs von Sauerstoff. Eine Spur Sauerstoff wirkt auf Myoglobin allein kaum ein, der Gang des Potentials bei der Titration wird nur sehr wenig geändert, der Verbrauch des Sauerstoffs geht nur langsam vor sich. Ganz anders verhält sich Myoglobin-Cytochrom. In Gegenwart von Pyridin wird jede Spur Sauerstoff sehr schnell aufgenommen und das Potential bleibt fast auf einem Punkt stehen, wenn dauernd etwas Sauerstoff zutreten kann und die Zugabe des Reduktionsmittels nicht zu schnell und nicht in zu großen Mengen erfolgt.

An diesem Punkt zeigt die Lösung das Oxymyoglobinspektrum. Das Redoxpotential (p_H 7,4) liegt bei + 0,16 Volt. Wenn dauernd ein wenig Sauerstoff zutreten kann, gelingt es mit 1 %iger Natriumhydrosulfitlösung oft kaum, das Potential wesentlich unter diesen Punkt herabzudrücken, im Gegensatz zu Myoglobin ohne Pyridin. Eine Aufnahme der ganzen Potentialkurve in Gegenwart von wenig Sauerstoff ergibt, daß Oxymyoglobin bis etwa + 0,10 Volt beständig ist. Bei + 0,10 Volt tritt oft schon etwas reduziertes Cytochrom auf, bei + 0,06 Volt ist das Cytochromspektrum stark ausgebildet ohne jede Beimischung von Oxymyoglobin. Nach der positiven Seite gelangt man bis etwa + 0,22 Volt, indem man einen starken Luftstrom durchleitet. Bewirkt man die Oxydation dagegen mit Kaliumferricyanid, so ist Oxymyoglobin nur bis etwa + 0,19 Volt beständig, bei + 0,20 Volt sieht man statt des Oxymyoglobinspektrums nur die verwaschenen Banden des oxydierten Cytochroms. Alle Angaben gelten für p_H 7,4.

Bemerkt sei noch, daß eine Lösung von oxydiertem Myoglobin in Gegenwart von Blausäure bei + 0,03 Volt noch das Spektrum des Cyanmetamyoglobins zeigt, während bei stark negativen Werten des Potentials das Cytochromspektrum auftritt. CO-Myoglobin ist dagegen bis zu stark negativen Potentialen beständig.

Bei Sauerstoffgegenwart ist also Myoglobin + Pyridin erheblich positiver, d. h. stärker oxydierend als Myoglobin allein. Ein ziemlich positives Redoxpotential hat aber wie erwähnt auch Hämoglobin/Methämoglobin. Was das Myoglobin-Cytochrom jedoch vor den anderen Häminsystemen besonders auszeichnet, ist die große Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs auch in einer Lösung mit ziemlich positivem Potential.

Der große Unterschied in der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs läßt sich noch durch folgenden Versuch anschaulich machen. In einer Metamyoglobinlösung erscheinen auf Zugabe von Hydrochinon die Absorptionsstreifen des Oxymyoglobins. Metamyoglobin wird also durch Hydrochinon (E_0 p_H 7,4 = + 0,25 Volt) zu einem gewissen Betrag reduziert. Das reduzierte Myoglobin lagert den in der Lösung befindlichen Sauerstoff an. Dadurch wird die Reaktion mit Hydrochinon erst ermöglicht, wie ein Vergleich der Redoxpotentiale zeigt. Die gleichen Erscheinungen werden auch bei Gegenwart von Pyridin beobachtet. Ein großer Unterschied ist jedoch in der Geschwindigkeit festzustellen, mit der die Oxymyoglobinstreifen auftreten. Während die Banden des Oxymyoglobins in Gegenwart von Pyridin schon nach 10 Sekunden in voller Stärke sichtbar sind, erfordert die Reaktion ohne Pyridin etwa 40 Sekunden zur vollen Ausbildung. Die Geschwindigkeit ist mit Pyridin etwa viermal größer. Die angewandten Mengen waren: 2 ccm 0,5 %iges Metamyoglobin in Pufferlösung von p_H 7,4, 0,1 ccm 10 %iges Pyridin, 1 ccm 0,01 %iges Hydrochinon.

Infolge der Geschwindigkeit der Sauerstoffabsorption trotz verhältnismäßig positivem Redoxpotential ist Myoglobin-Cytochrom hervorragend befähigt, unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff oxydierend zu wirken. Dabei spielt sich folgender Kreislauf ab:

Oxydiertes Cytochrom → reduziertes Cytochrom $\xrightarrow{O_2}$ Oxymyoglobin → oxydiertes Cytochrom.

Myoglobin erscheint nach unseren Versuchen als der zentrale Häminfarbstoff der Atmung*. Myoglobin allein dient als Sauerstoffspeicher. Eine N-Verbindung läßt daraus ein auch bei ziemlich positivem Potential rasch Sauerstoff absorbierendes Redoxsystem, das Cytochrom, entstehen. Durch die Menge und wahrscheinlich auch durch die Bin-

* Die Redoxpotentiale lassen erwarten, daß Diaphorase von Myoglobin-Cytochrom leicht oxydiert wird.

dungsfestigkeit der N-Verbindung steuert der Organismus vermutlich den Anteil der Speicherung und des Verbrauchs von Sauerstoff. Man muß annehmen, daß zwischen Myoglobin und Cytochrom ein Gleichgewicht besteht, auch wenn die N-Verbindung fester an das Myoglobin gebunden ist. Im Gegensatz zu Myoglobin dient Hämoglobin nur zum Transport von Sauerstoff, eine N-Verbindung darf es also nicht in ein Sauerstoff übertragendes Redoxsystem umwandeln. Aus Hämoglobin läßt sich kein Cytochrom herstellen.

Zusammenfassung.

1. Frühere Angaben über die Möglichkeit einer reversiblen Umwandlung von Myoglobin in Cytochrom (*Bechtold* 1934/35) werden bestätigt und erweitert. Auch rein dargestelltes Myoglobin läßt sich reversibel in Cytochrom umwandeln. Die Umwandlung erfolgt außer durch Hydrazinhydrat auch durch Pyridin zusammen mit einem Reduktionsmittel bei einem p_H gleich oder größer als 7. Ebenso ist Nicotinsäureamid wirksam, jedoch langsamer. Dieses Myoglobin-Cytochrom wird durch Sauerstoff in Oxymyoglobin zurückverwandelt. Mit Kohlenoxyd entsteht CO-Myoglobin.

2. Das aus Myoglobin erhaltene Cytochrom wird durch seine Absorptionskurve charakterisiert und in Spektrogrammen mit nativem Cytochrom verglichen.

3. Denaturiertes Myoglobin wird durch Hydrazinhydrat oder Pyridin nicht in Cytochrom, sondern in Myochromogen übergeführt. Beim Stehen in Hydrazinhydratlösung wandelt sich dieses Myochromogen langsam in einen anderen Farbstoff um, dessen Banden um 10 mμ nach dem kurzwelligeren Gebiet verschoben sind. Sie haben die Lage des „Cytochroms *c*" nach *Theorell*. Weder dieser Farbstoff noch Myochromogen lassen sich in Oxymyoglobin zurückverwandeln. In „Cytochrom *c*" nach *Theorell* wird ein Denaturierungsprodukt erblickt.

4. In Myoglobin-Cytochromlösungen wurden Redoxpotentiale gemessen, sowohl unter Ausschluß als auch mit Zutritt von Sauerstoff. Dabei wurde festgestellt, daß die Geschwindigkeit der Sauerstoffübertragung bei Cytochrom viel größer ist als bei Myoglobin.

Literatur.

1) *E. Bechtold*, Der Muskelfarbstoff usw. Stuttgart 1935. — 2) *H. A. Theorell*, diese Zeitschr. **252**, 1, 1932. — 3) *D. Keilin*, Erg. d. Enzymforschung **2**, 239, 1933. — 4) *O. Warburg* und *E. Negelein*, diese Zeitschr. **233**, 486, 1931. — 5) *K. Pfeilsticker*, Zeitschr. f. Elektrochem. **43**, 719, 1937. — 6) *J. Roche*, Soc. Biol. **99**, 197, 1928; *R. Hill* u. *F. Holden*, Biochem. J. **20**, 1326, 1926; vgl. Handb. d. Biochem., Ergänzungswerk **1** (1), 375, 1933. — 7) *J. B. Conant* u. *A. M. Pappenheimer*, J. biol. Chem. **98**, 57, 1932. — 8) J. B. *Conant*, *G. A. Alles* u. *C. O. Tongberg*, ebenda **79**, 89, 1928. — 9) *D. E. Green*, Proc. Roy. Soc. Ser. B. **114**, 423, 1934.

Die Aktivierungsenergie der Reaktion zwischen Kohlendioxyd und Wasser.

Von

Manfred Kiese.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 9. Dezember 1940.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Die Reaktion zwischen CO_2 und Wasser, $CO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2CO_3$ (I), ist erst in jüngerer Zeit Gegenstand genauerer Untersuchung geworden. Über den Einfluß der Temperatur auf die Reaktion liegen nur einige orientierende Daten vor. Sowohl *Faurholt*[1] wie *Brinkman, Margaria* und *Roughton*[2] haben bei ihren kinetischen Untersuchungen einige Messungen bei einer höheren Temperatur ausgeführt. Aus den Daten *Faurholts* ergab sich ein Temperaturkoeffizient von $Q_{10} = 3{,}3$, aus den Daten von *Brinkman, Margaria* und *Roughton* $Q_{10} = 3{,}2$. Diese Messungsergebnisse beziehen sich jedoch nicht unmittelbar auf die Reaktion zwischen CO_2 und Wasser. Aus methodischen Gründen werden Messungen der Hydratationsgeschwindigkeit in Pufferlösungen ausgeführt und schwache Säuren katalysieren die Reaktion[3, 4]. Die Geschwindigkeit der unkatalysierten Reaktion wurde ermittelt durch Extrapolation von Messungen der Geschwindigkeit bei verschiedenen Pufferkonzentrationen und gleichem p_H zu unendlicher Verdünnung.

In Lösungen von $p_H > 7$ nimmt die Geschwindigkeit der Hydratation von CO_2 mit der Hydroxylionenkonzentration zu. Hydroxylionen wirken katalytisch oder gehen unmittelbar eine endgültige Reaktion ein: $CO_2 + OH^- \rightleftarrows HCO^-$ (II). Kinetisch ist bisher eine Trennung der beiden Möglichkeiten nicht gelungen. Wenn das Hydroxylion nur vorübergehend mit dem CO_2 reagiert, um sein Hydratationswasser abzugeben, so erfolgt diese Katalyse nach dem Mechanismus der Bildung einer Zwischenverbindung, deren Zerfall wesentlich schneller ist als die Bildung.

Für beide Reaktionen, die zwischen CO_2 und Wasser und die zwischen CO_2 und Hydroxylionen, wurde auf Grund von Bestimmungen der unkatalysierten Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Temperaturen die Aktivierungsenergie ermittelt.

---

[1] *C. Faurholt*, J. chem. phys. **21**, 400, 1924. — [2] *R. Brinkman, R. Margaria, F. J. W. Roughton*, Phil. transact. roy. Soc. London (A) **232**, 165, 1933. — [3] *F. J. W. Roughton* u. *V. H. Booth*, Biochem. J. **32**, 2094, 1938. — [4] *M. Kiese* u. *A. B. Hastings*, J. biol. chem. **132**, 267, 1940.

Methodik.

Die Geschwindigkeit der Hydratation von CO_2 wurde manometrisch gemessen. Auf eine Pufferlösung von bestimmter Konzentration und p_H wurde ein bestimmter CO_2-Druck gegeben und die Druckabnahme während heftigen Schüttelns des Reaktionsgefäßes verfolgt. Die Apparatur ist an anderer Stelle beschrieben [1]. Sie wurde erweitert durch ein Glasmembranmanometer mit optischer Übertragung, das als Differentialmanometer dem Flüssigkeitsdifferentialmanometer parallel geschaltet war und wahlweise statt des Flüssigkeitsmanometers benutzt

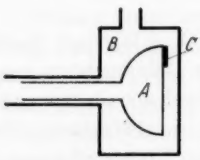

Abb. 1. Glasmembran - Differentialmanometer. *A*. Glaskugel mit abgeflachter Membran, in Verbindung mit dem Reaktionsgefäß. *B*. Die Manometermembran umgebendes Gefäß, in Verbindung mit dem Kompensationsgefäß. *C*. Metallspiegel auf der Glasmembran.

werden konnte. Das Glasmembranmanometer wurde für hohe Reaktionsgeschwindigkeiten benutzt, bei denen die Druckmessung mit dem Flüssigkeitsmanometer infolge dessen Trägheit hätte fehlerhaft werden können. Das Manometer (Abb. 1) bestand aus einer Glaskugel *A* am Ende eines Rohres, deren Scheitel in der Flamme zu einer planen Membran abgeflacht war. Zwischen Mitte und Rand war ein kleiner Spiegel *C* aufgekittet. Das Manometer war in Verbindung mit dem Reaktionsgefäß und war eingekittet in ein Gehäuse *B*, das mit dem Kompensationsgefäß verbunden war. Vor der Manometermembran bestand das Gehäuse aus einem planen Glase. Die Ausschläge des vom Spiegel reflektierten Strahles wurden entweder auf eine Skala projiziert und abgelesen oder mit einem Photokymographion registriert.

Wie in früheren Untersuchungen wurde die Pufferlösung in der Apparatur auf Wasserdampfdruck evakuiert und dann ein bestimmter CO_2-Druck daraufgegeben. Phosphat und Pyrophosphat wurden als Puffer benutzt. Bei stillstehendem Reaktionsgefäß verlief die CO_2-Aufnahme nur äußerst langsam, so daß die erste Druckmessung vor Beginn des Schüttelns in Ruhe vorgenommen werden konnte. 5 Sekunden nach Beginn des Schüttelns wurde die zweite Manometerablesung vorgenommen, die dritte nach 15 Sekunden und die weiteren ebenfalls in Zwischenräumen von 15 Sekunden. Für jedes Intervall wurde die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung errechnet.

Da die Reaktion bei höheren Temperaturen recht schnell verläuft, wurde das Reaktionsgefäß bei diesen Reaktionen mit einer Geschwindigkeit von 600 bis 700 Doppelschwingungen/Minute geschüttelt, um Verzerrungen durch die Diffusion zu vermeiden. Die Lösung von CO_2 war in 3 bis 4 Sekunden erfolgt.

[1] *M. Kiese*, Diese Zeitschr. **305**, 22, 1940.

Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Reaktion zwischen CO_2 und Wasser verläuft zu einem Gleichgewicht mit der Geschwindigkeit

$$-\frac{d\,CO_2}{dt} = K_{CO_2}\,[CO_2] - K_{H_2CO_3}\,[H_2CO_3], \qquad \text{(III)}$$

wo K_{CO_2} die Geschwindigkeitskonstante für die Hydratation und $K_{H_2CO_3}$ die Geschwindigkeitskonstante für die Dehydratation ist. Die Hydratation sowohl wie die Dehydratation verlaufen als Reaktion erster Ordnung. Wird die Geschwindigkeit am Anfang der Reaktion ermittelt, so kann aus ihr unmittelbar die Geschwindigkeitskonstante errechnet werden. Die Rückreaktion, Dehydratation, ist dann Null. Die Geschwindigkeitskonstante der Hydratation ist dann

$$K_{CO_2} = \frac{1}{t_2 - t_1} \cdot \frac{(V_G/V_L + \alpha)}{\alpha} \cdot \ln \frac{p_1}{p_2}, \qquad \text{(IV)}$$

wo p_1 und p_2 der CO_2-Druck zur Zeit t_1 bzw. t_2 sind, Zeit t in Sekunden. α ist der *Bunsen*sche Löslichkeitskoeffizient von CO_2. V_G ist das Volumen der Gasphase, V_L das Volumen der Flüssigkeitsphase.

Die Reaktion zwischen CO_2 und Hydroxylionen wird neben der zwischen CO_2 und Wasser erst meßbar, wenn die Hydroxylionenkonzentration $> 10^{-7}$ mol/l wird. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion (II) ist

$$-\frac{d\,CO_2}{dt} = K_{CO_2,\,OH^-}\,[CO_2]\,[OH^-] - K_{HCO_3^-}\,[HCO_3^-]. \qquad \text{(V)}$$

Unter Vernachlässigung der Rückreaktion ist auch hier $K_{CO_2,\,OH^-}$ bestimmbar:

$$K_{CO_2,\,OH^-} \cdot [OH^-] = \frac{1}{t_2 - t_1} \cdot \frac{(V_G/V_L + \alpha)}{\alpha} \cdot \ln \frac{p_1}{p_2}. \qquad \text{(VI)}$$

In einem gewissen Bereich der Hydroxylionenkonzentrationen sind die Reaktionen von CO_2 mit Wasser und Hydroxylionen von ähnlicher Größenordnung. Hier kann die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion (II) durch Subtraktion der Reaktion (I) von der Gesamtgeschwindigkeit bestimmt werden.

$$K = K_{CO_2} + K_{CO_2,\,OH^-}\,[OH^-] = \frac{1}{t_2 - t_1} \cdot \frac{(V_G/V_L) + \alpha}{\alpha} \cdot \ln \frac{p_1}{p_2}. \qquad \text{(VII)}$$

Die einfache Ableitung der Gleichungen (IV), (VI), (VII) ist bei *Roughton*[1] gegeben.

Aus technischen Gründen ist eine Messung der Hydratationsgeschwindigkeit ganz am Anfang der Reaktion nicht möglich, da immer-

[1] *R. Brinkman, R. Margaria, F. J. W. Roughton*, Phil. transact. roy. Soc. London (A) **232**, 165, 1933.

hin einige Sekunden für den Vorgang der Lösung des CO_2 in der Flüssigkeitsphase notwendig sind. Bei langsamer Reaktionsgeschwindigkeit stört die CO_2-Menge, die schon während der ersten Sekunden hydratisiert wird, die Messung nicht merklich und die ersten sicher meßbaren Geschwindigkeiten der Hydratation ergeben richtige Geschwindigkeitskonstanten (K'_{CO_2}). Verläuft die Reaktion aber schnell — Katalyse, hohe Temperatur, hohe CO_2-Drucke —, so wird schon in den ersten Sekunden und während des ersten zur Messung erforderlichen Zeitintervalls soviel CO_2 hydratisiert, daß die Rückreaktion, die Dehydratation, merklich wird. Die dann gemessenen Geschwindigkeiten sind also nicht die der reinen Hydratation und die Konstanten sind zu niedrig.

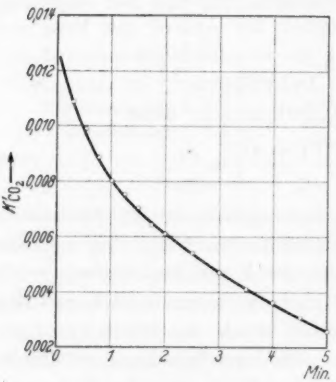

Abb. 2. Hydratation von CO_2 in 10 ccm 0,04 mol. Phosphat, p_H 7,4, mit HOBr $7 \cdot 10^{-5}$ mol. als Katalysator. — Anfänglicher CO_2-Druck 80 mm Hg, $t = 1{,}0°$. — Gang der Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung mit der Zeit. Extrapolation zur Zeit 0.

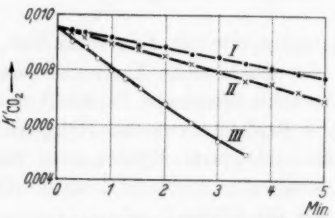

Abb. 3. Geschwindigkeit der Hydratation von CO_2 bei verschiedenen CO_2-Drucken. Hydratation von CO_2 in 10 ccm 0,1 mol. Phosphat, p_H 7,4, $t = 8{,}0°$. — Anfänglicher CO_2-Druck bei I 20 mm Hg, II 95 mm Hg, III 325 mm Hg.

Die aus der Druckabnahme in der Gasphase errechnete „Konstante" erster Ordnung nimmt also im Laufe der Reaktion stetig ab. Der richtige Wert der Reaktionskonstanten der Hydratation, nämlich der am allerersten Anfang der Reaktion, ergibt sich durch Extrapolation der „Konstanten" verschiedener Zeiten zur Zeit Null. In Abb. 2 ist ein Beispiel für dieses Verfahren der Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten am Anfang der Reaktion gegeben.

Der Gang der Geschwindigkeitskonstanten mit der Zeit beruht nicht etwa darauf, daß die Reaktion gar nicht erster Ordnung und die Errechnung einer entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten darum unzulässig ist. In Abb. 3 sind Messungsergebnisse bei verschiedenen Anfangsdrucken von CO_2 wiedergegeben. Diese ergeben bei der Extrapolation gut übereinstimmende Werte der Geschwindigkeitskonstanten. Die Notwendigkeit der Extrapolation wird durch dieses Beispiel anschaulich dargestellt, obgleich in diesem Falle die Geschwindigkeit noch

gering und die Abweichung der Werte bei 15 Sekunden noch nicht erheblich ist. Eine rechnerische Korrektur für die Rückreaktion zur Ermittlung der richtigen Geschwindigkeitskonstanten dürfte erheblich komplizierter sein. Durch die hier angewandte Extrapolation werden ferner auch Einflüsse der p_H-Änderung auf die Reaktion oder die Aktivität eines Katalysators oder bei Anwendung von Kohlensäureanhydrase die fortschreitende Oberflächendenaturierung des Ferments infolge des heftigen Schüttelns eliminiert. Alle im folgenden benutzten Reaktionskonstanten wurden auf dem eben beschriebenen Wege gewonnen.

Für die Bestimmung der Geschwindigkeit der Reaktion von CO_2 mit Hydroxylionen gilt mutatis mutandis das gleiche wie für die der Geschwindigkeit von CO_2 mit Wasser.

Bei höherer Hydroxylionenkonzentration verläuft die Reaktion (II) so schnell, daß Reaktion (I) daneben vernachlässigt werden kann. Mit der hier angewandten Methode können unter solchen Bedingungen Messungen bei niedriger Temperatur noch durchgeführt werden, bei höheren Temperaturen aber nicht. Um die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen CO_2 und Hydroxylionen über einen Temperaturbereich von 0 bis 17,5° C messen zu können, wurden Lösungen von p_H 9,0 bis 10,0 benutzt, wo die Geschwindigkeit der Reaktion (II) durch Subtraktion der Reaktion (I) von der Gesamtgeschwindigkeit entsprechend (VII) gefunden wurde.

Unter den Bedingungen der hier beschriebenen Versuche müssen für die Messung der Hydratation Pufferlösungen verwendet werden. Die Geschwindigkeit der unkatalysierten Reaktionen (I) und (II) bei einem bestimmten p_H und Temperatur wurde nach Messung bei verschiedenen Pufferkonzentrationen durch Extrapolation zu unendlicher Verdünnung bestimmt. Im folgenden soll die Konstante der unkatalysierten Reaktion zwischen CO_2 und Wasser bzw. CO_2 und Hydroxylionen als K_{CO_2} bzw. K_{CO_2, OH^-} bezeichnet werden und die der Reaktion in einer bestimmten Pufferkonzentration oder unter anderen reaktionsändernden Einflüssen als K'_{CO_2} bzw. K'_{CO_2, OH^-}.

Berechnung der Aktivierungsenergie.

Die Aktivierungsenergie der Reaktionen I und II wurde aus der Änderung der Geschwindigkeit der Reaktionen mit der Temperatur ermittelt nach der *Arrhenius*-Gleichung $K = Z e^{-\frac{E}{RT}}$ $\ln K = \ln Z - \frac{E}{RT}$. Wurde log K gegen $1/T$ aufgetragen, so ergab die Neigung der Geraden multipliziert mit 2,303 R die Aktivierungsenergie. Unter Aktivierungsenergie wurde die bei einer bestimmten Temperatur zur Reaktion

notwendige Extraenergie verstanden, nicht der Energieüberschuß gegenüber dem Zustand bei $T_{abs} = 0$, das kritische Inkrement.

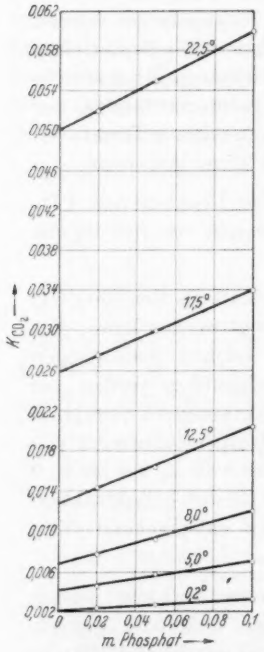

Abb. 4. Geschwindigkeit der Hydratation von CO_2 in Phosphatlösungen verschiedener Konzentration bei verschiedenen Temperaturen. p_H 7,4. Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten der unkatalysierten Reaktion.

Die Aktivierungsenergie der Reaktion $CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3$.

Die Geschwindigkeit der Hydratation von CO_2, K_{CO_2} im Temperaturbereich von 0,2 bis 22,5° ist in den Daten der Abb. 4 gegeben. Aus den Werten von K'_{CO_2} für bestimmte Pufferkonzentrationen wurde für jede Temperatur K_{CO_2} ermittelt. Außer den in Abb. 4 mitgeteilten Daten standen noch Messungsergebnisse bei der Temperatur von — 5,0° zur Verfügung. Die Hydratation war bei dieser Temperatur in Glycerin-Wassergemischen mit Phosphat als Puffer bestimmt worden. K_{CO_2} ergab sich zu 0,001. Der Verlauf der Kurven in Abb. 4 zeigt, daß auch der katalytische Einfluß des Phosphats mit der Temperatur zunahm. Die Kinetik der Katalysatoren wird noch an anderer Stelle[1] behandelt werden.

In Tabelle I sind die zur Ermittlung der Aktivierungsenergie auf oben angegebenem Wege erforderlichen Daten zusammengestellt. Wird log K_{CO_2} in Abhängigkeit von $1/T$ aufgetragen, so liegen die einzelnen Daten sehr nahe an einer Geraden (Abb. 5). Die Aktivierung der Reaktion zwischen CO_2 und Wasser folgt also der *Arrhenius*-Gleichung. Die Neigung der Geraden ist $\frac{E}{R} = N = 5060$. Die Aktivierungs-

Tabelle I. Geschwindigkeit der Reaktion zwischen Wasser und CO_2 bei verschiedenen Temperaturen.

Temperatur °C	T_{abs}	$\frac{1}{T}$	K_{CO_2} sec^{-1}	log K_{CO_2}
— 5,0	268,1	0,003 73	0,001 0	— 3,000
+ 0,2	273,3	0,003 66	0,002 05	— 2,688
+ 5,0	278,1	0,003 598	0,004 1	— 2,387
+ 8,0	281,1	0,003 56	0,006 9	— 2,161
+ 12,5	285,6	0,003 505	0,012 6	— 1,900
+ 17,5	290,6	0,003 441	0,025 8	— 1,588
+ 22,5	295,6	0,003 384	0,050 0	— 1,301

[1] *M. Kiese*, diese Zeitschr. (in Vorbereitung).

energie ist $E = 2{,}303\ R \cdot N$, $R = 1{,}987\ \text{Cal} \cdot T^{-1}$. Demnach ergibt sich die Aktivierungsenergie zu $E = 23100$ Cal.

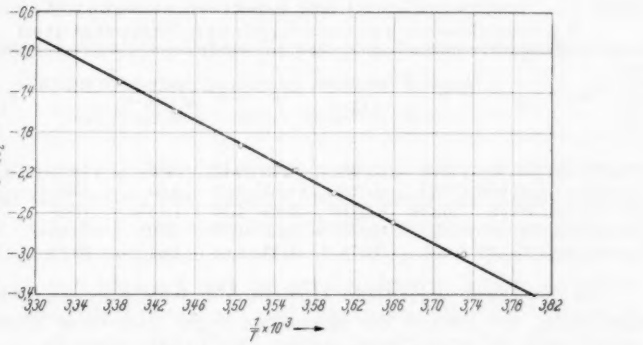

Abb. 5. log K_{CO_2} aufgetragen gegen $1/T$.

Die Aktivierungsenergie der Reaktion $CO_2 + OH^- \rightarrow HCO_3$.

Die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen CO_2 und Hydroxylionen wurde gemäß dem oben beschriebenen Verfahren unter Benutzung der Gleichung (VII) bei $p_H = 9{,}6$ bestimmt. Entsprechend dem in Abb. 4 wiedergegebenen Vorgehen wurde in Pyrophosphatlösungen einer Konzentration von 0,1, 0,05, 0,02 und 0,01 m die Geschwindigkeit der Hydratation gemessen und der Wert für unendliche Verdünnung des Puffers extrapoliert. Der p_H-Wert von 9,6 bezieht sich auf den gleichen Zustand unendlicher Verdünnung des Puffers. Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengestellt. Die Hydratationsgeschwindigkeit wurde im Temperaturbereich von 0,2 bis 17,5° gemessen. Die Bedeutung der einzelnen Daten ist nach den Erörterungen über das Verfahren verständlich. Die Dissoziationskonstanten des Wassers, pK_W, wurden aus Messungen von *Harned* und *Hamer*[1] bei höheren Temperaturen ermittelt.

Die Werte von K_{CO_2, OH^-} sind niedriger als die früher mitgeteilten[2] ($K_{CO_2, OH^-} = 2500$ bei 5°). Der Unterschied beruht wohl darauf, daß in den früheren Messungen $[OH^-]$ nicht genau für den Zustand unendlicher Verdünnung des Puffers, für den K_{CO_2, OH^-} gilt, bestimmt wurde. Überhaupt sind die Werte von K_{CO_2, OH^-} nicht von der gleichen Genauigkeit wie die von K_{CO_2}, da in ihre Bestimmung K_{CO_2}, p_H und die Dissoziationskonstante des Wassers eingehen. Entsprechend kommt auch dem Werte der Aktivierungsenergie nicht gleiche Genauigkeit zu

[1] *H. S. Harned* u. *W. J. Hamer*, J. amer. chem. Soc. **55**, 2194, 1933. — [2] *M. Kiese* u. *A. B. Hastings*, J. biol. chem. **132**, 267, 1940.

wie dem der Reaktion zwischen CO_2 und Wasser. Jedoch dürfte hier der Fehler geringer sein als für die absoluten Werte von K_{CO_2, OH^-}.

Tabelle II. Geschwindigkeit der Reaktion zwischen Wasser und Hydroxylionen bei verschiedenen Temperaturen.

Temperatur °C	T_{abs}	$\frac{1}{T}$	K	$K_{CO_2, OH^-} \cdot [OH]$	pK_w	pOH^-	$\frac{[OH^-]}{M/l \cdot 10^{-5}}$	K_{CO_2, OH^-} sec^{-1}	$\log K_{CO_2, OH^-}$
0,2	273,3	0,003 66	0,010	0,008	14,78	5,18	0,66	1210	3,084
5,0	278,1	0,003 598	0,019	0,015	14,62	5,02	0,95	1580	3,199
8,0	281,1	0,003 56	0,0286	0,0216	14,53	4,93	1,175	1840	3,265
12,5	285,6	0,003 505	0,0502	0,038	14,39	4,79	1,622	2340	3,370
17,5	290,6	0,003 441	0,104	0,078	14,23	4,63	2,345	3325	3,522

Von den Daten der Tabelle II ist in Abb. 6 $\log K_{CO_2, OH^-}$ gegen $1/T$ aufgetragen. Im Bereich der Messungen liegen auch diese Werte nahe einer Geraden. Deren Neigung ist $N = 1966$. Die Aktivierungsenergie $E = 2{,}303\ R \cdot N$ ist dann $E = 9000$ Cal.

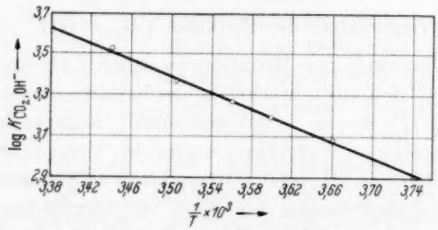

Abb. 6. $\log K_{CO_2, OH^-}$ aufgetragen gegen $1/T$.

Erwartungsgemäß ist die Aktivierungsenergie der Reaktion von CO_2 mit Hydroxylionen wesentlich geringer als die der Reaktion von CO_2 mit Wasser. Die Aktivierungsenergie der Reaktion II liegt an der unteren Grenze der Aktivierungsenergien, die für Katalysen durch Hydroxylionen in wässeriger Lösung bekannt sind.

Von einem gewissen biologischen Interesse ist die Hydratationsgeschwindigkeit des CO_2 bei 38°. Aus der Neigung der Geraden in Abb. 5 ergibt sich für 38° $K_{CO_2} = 0{,}36$ (Sek.$^{-1}$).

Zusammenfassung.

Für die Reaktion $CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3$ wurde aus Messungen der Reaktionsgeschwindigkeit im Bereich von $-5°$ bis $+22{,}5°$ die Aktivierungsenergie errechnet. Sie ergab sich zu 23100 Cal.

Für die Reaktion $CO_2 + OH^- \rightarrow HCO_3^-$ wurde aus Messungen der Reaktionsgeschwindigkeit im Bereich von $+0{,}2°$ bis $+17{,}5°$ die Aktivierungsenergie errechnet. Sie ergab sich zu 9000 Cal.

Die Geschwindigkeit der Hydratation von CO_2 bei 38° ist $K_{CO_2} = 0{,}36$ (Sek.$^{-1}$).

Die Aromabildung bei der Rahmsäuerung.

Von

Artturi I. Virtanen, Pekka Kontio und **Torsten Storgards.**

(Aus dem Biochemischen Institut, Helsinki.)

(Eingegangen am 6. Dezember 1940.)

Die Bildung von Acetylmethylcarbinol und von dem eigentlichen Aromastoff der Butter, dem Diacetyl, beim Säuern des Rahms erfolgt nach der allgemein angenommenen Auffassung aus Citronensäure. Die Milchsäure-Streptokokken säuern die Milch bzw. den Rahm bis zu einem p_H von etwa 4,3 und die Aromabakterien bilden bei saurer Reaktion Acetylmethylcarbinol und in Gegenwart von Sauerstoff Diacetyl. *v. Beynum* und *Pette* [1] haben neuerdings den Reaktionsmechanismus der Bildung von Aromastoffen [2] aus Citronensäure zu erklären versucht. Sie nehmen auf Grund ihrer experimentellen Befunde an, daß Citronensäure zuerst zu Brenztraubensäure, Essigsäure und CO_2 aufgespalten wird und daß aus Acetaldehyd bei saurer Reaktion Acetylmethylcarbinol entsteht. Bei neutraler Reaktion wird Acetaldehyd in Essigsäure und Alkohol verwandelt.

Da viele Mikroorganismen, wie z. B. Aerogenes-Bakterien, Acetylmethylcarbinol aus Zucker bilden, erscheint es auffallend, daß die Aromabakterien nur aus Citronensäure Aromastoffe bilden sollten, obwohl sie Glucose unter Bildung von u. a. Milchsäure und Essigsäure vergären, wobei als Zwischenprodukt Brenztraubensäure entsteht. In diesem Laboratorium hat *Storgårds* [3] neuerdings festgestellt, daß die *Aromabakteriensuspension* in der Glucoselösung und auch ebenso in der Citronensäurelösung merkwürdigerweise keine Aromastoffe bildet, obwohl das p_H der Lösung etwa 4, d. h. günstig für die Bildung der Aromastoffe ist. Erst wenn die Lösung *sowohl Glucose als Citronensäure* enthält, werden durch die Bakteriensuspension in Gegenwart von Ca-Ionen [4] Aromastoffe gebildet. Die Brenztrauben- und Oxalessig-

[1] *J. van Beynum* u. *J. W. Pette*, Verslagen van Landbouwkundige Onderzoekingen, Nr. 44 (3), C. 207, 1938. — [2] Acetylmethylcarbinol und dessen Oxydations- bzw. Reduktionsprodukte, Diacetyl und Butylenglykol, werden kurz als Aromastoffe bezeichnet, obwohl nur Diacetyl Aroma hat. — [3] *T. Storgårds*, Meijeritieteell. Aikakauskirja (Zeitschr. f. Molkereikde. **2**, 22, 1940, finnisch mit deutscher Zusammenfassung). — [4] Die Unentbehrlichkeit der Ca-Ionen bei der Bildung von Acetylmethylcarbinol ist sehr interessant. *Peldan* hat in diesem Laboratorium früher bewiesen (Dissertation 1939), daß die Ca-Ionen unentbehrlich für die Buttersäurebildung bei der Buttersäuregärung sind. Es scheint, daß die Ca-Ionen bei der Kondensation der Brenztraubensäure zum Brenztraubensäurealdol mitwirken.

säure sind dagegen auch allein sehr gute Bilder von Aromastoffen. Acetaldehyd als Zwischenprodukt konnte *Storgårds* nicht finden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß sowohl Glucose als Citronensäure für die Bildung der Aromastoffe unentbehrlich sind und daß der Anteil des Zuckers nicht auf die Säuerung der Gäransätze begrenzt ist. Welche Aufgabe der Zucker und die Citronensäure bei der Aromabildung haben, ist aus den erwähnten Beobachtungen nicht zu ersehen. Die Möglichkeit, daß die Citronensäure bzw. ihre Spaltungsprodukte nur als Wasserstoffakzeptor bei der Bildung von Aromastoffen wirken und daß der Zucker das eigentliche Substrat dieser Stoffe sein könnte, ist vorhanden. Irgendeinen Beweis dafür liefern diese Ergebnisse jedoch nicht.

Um Klarheit über die Ausgangssubstanz der Aromastoffe bei der Rahmsäuerung zu bekommen, haben wir Versuche mit Aromabakteriensuspensionen in Glucoselösungen angestellt, zu welchen während des Versuchs Methylenblau oder Chinon allmählich hinzugegeben wurde. Die Versuche sind im folgenden beschrieben.

Versuche.

Die zu den Gärversuchen nötige Aromabakterienmasse wurde durch die Züchtung von Aromabakterien (Betacoccus Stamm K 4) bei einer Temperatur von 25° in folgender Nährlösung hergestellt [1].

Tomatenauszug	500 ccm *
Leitungswasser	500 ccm
Pepton	2 g
Glucose	5 g
Citronensäure	1 g
KH_2PO_4	3 g
$MgSO_4$	0,2 g

* 1 kg Tomaten + 2 Liter Wasser.

Das p_H der fertigen, sterilisierten Nährlösung war 6,5.

Etwa 16 Stunden nach der Impfung wurde NaOH-Lösung zugesetzt (der Farbstoff der Tomaten diente als Indikator). 3 Stunden nach dieser Neutralisation, als das Maximum der Zellenzahl erreicht war, wurde die Nährlösung zentrifugiert, die abgeschleuderte Bakterienmasse zweimal mit sterilem Wasser ausgewaschen, jedesmal von neuem zentrifugiert und in einer 20—30fachen Wassermenge aufgeschlemmt.

Das p_H der Gärlösungen wurde mittels während der Gärung entnommener Proben kontrolliert und gegebenenfalls durch Zusatz von NaOH- oder HCl-Lösung reguliert. Die Gärung fand bei Zimmertemperatur (20 bis 21° C) statt.

[1] *T. Storgårds*, l. c.

Quantitative Zuckerbestimmungen wurden nur in den Serien 30. Oktober und 22. November nach *Bertrand-Schoorl* ausgeführt, mit Ausnahme des Chinon enthaltenden Versuchs, in welchem der zurückgebliebene Zucker durch Vergären mit Hefe und Bestimmung des entstandenen CO_2 ermittelt wurde. Das gebildete Hydrochinon wurde jodometrisch bestimmt. Citronensäure bestimmten wir nach *Kometiani* [1].

Die Diacetyl- und Acetylmethylcarbinol-Bestimmungen wurden nach *van Niel* [2] und die Butylenglykol-Bestimmungen nach *Kniphorst* und *Kruisheer* [3] ausgeführt. Diacetyl und Butylenglykol wurden unter den vorhandenen Versuchsbedingungen in keiner Gärlösung gebildet. Als Gefäße dienten 500-ccm-Rundkolben.

Aus den Versuchen geht hervor, daß Acetylmethylcarbinol durch Aromabakterien in Gegenwart von Methylenblau oder Chinon aus Glucose entsteht. Dagegen wird aus Glucose ohne zugesetzte Wasserstoffakzeptoren überhaupt kein Acetylmethylcarbinol gebildet. Citronensäure gibt weder allein noch mit Methylenblau Acetylmethylcarbinol. Damit ist erwiesen, daß die Aromastoffe durch Aromabakterien aus Zucker und nicht aus Citronensäure entstehen. Weil aus der Brenztraubensäure sehr leicht Acetylmethylcarbinol gebildet wird, ist diese Ketosäure offenbar das Zwischenprodukt bei der Bildung der Aromastoffe. Man kann sich vorstellen, daß die unmittelbare Reduktion der Brenztraubensäure zur Milchsäure durch einen passenden Wasserstoffakzeptor, der das Glycerinphosphat zu Triosephosphat oxydiert, verhindert und daß die Bildung des Acetylmethylcarbinols dadurch ermöglicht wird.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Tabelle I.

Grundlösung im Versuch: 50 ccm m/15 KH_2PO_4 + 5 mg $CaCl_2$; 50 ccm Bakteriensuspension, 20×Verdünnung.

Versuchszeit: 15. bis 16. Oktober 1940.

Gärlösung	p_H	Gärzeit Std.	*Voges-Proskauer*	Ni-Dimethylglyoxim auf 100 ccm Gärlösung mg	Acetylmethylcarbinol in % der Glucose	Anmerkungen
Grundlösung + 25 ccm 4%ige Glucoselösung + 25 ccm Methylenblaulösung, 1:500 (allmählich zugesetzt)	6,07—3,82	24	1*	5,5	0,51	Zucker bis Ende vergoren. Mit 1 Mol Methylenblau wurden 0,36 Mol Acetylmethylcarbinol erhalten.

* Aus Destillat.

[1] *P. A. Kometiani*, Zeitschr. f. anal. Chem. **86**, 359, 1931. — [2] *C. B. van Niel*, diese Zeitschr. **187**, 472, 1927. — [3] *L. C. E. Kniphorst* u. *C. I. Kruisheer*, Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm. **73**, 1, 1937.

Tabelle II. Grundlösung im Versuch: 100 ccm m/15 KH_2PO_4 + 5 mg $CaCl_2$; 100 ccm Bakteriensuspension, 30 × Verdünnung. Versuchszeit: 24. bis 29. Oktober 1940.

Gärlösung	p_H *	Gärzeit Std.	*Voges-Proskauer*	Ni-Dimethylglyoxim auf 100 ccm Gärlösung mg	Acetylmethylcarbinol in % der Glucose	Anmerkungen
Versuch I						
Grundlösung + 50 ccm 4 %ige Glucoselösung + 55 ccm Methylenblau 1:500 (allmählich zugesetzt)	5,78–3,69 –4,43	21	1**	9,6	(0,9)	Spuren von Zucker. Mit 1 Mol Methylenblau wurden 0,59 Mol Acetylmethylcarbinol erhalten.
Versuch II						
Grundlösung + 50 ccm 4 %ige Glucoselösung + 50 ccm Chinonlösung 1:1000 (allmählich zugesetzt)	5,78–3,99	22	–	7,2	(0,7)	Spuren von Zucker. Mit 1 Mol Chinon wurden 0,33 Mol Acetylmethylcarbinol erhalten.
Versuch III						
Grundlösung + 50 ccm H_2O + 1 ccm Methylenblau 1:500	5,04–5,14 –4,40–4,74 –4,28–4,77 –4,13	118	–	–	–	Bakteriensuspension reduzierte kein Methylenblau mehr.

* Die Zahlen erläutern die p_H-Veränderungen während des Versuches. Die Steigerungen der p_H-Werte beruhen auf Alkalizusatz. – ** Aus Destillat.

Tabelle III. Grundlösung im Versuch: 100 ccm m/15 KH_2PO_4 + 5 mg $CaCl_2$; 100 ccm Bakteriensuspension, 25 × Verdünnung. Versuchszeit: 30. Oktober bis 2. November 1940.

Gärlösung	p_H	Gärzeit Std.	*Voges-Proskauer*	Ni-Dimethylglyoxim auf 100 ccm Gärlösung mg	Acetylmethylcarbinol in % der vergorenen Glucose	Anmerkungen
Versuch I						
Grundlösung + 50 ccm 4 %ige Glucoselösung + 65 ccm Methylenblau 1:500 (allmählich zugesetzt)	5,70–3,99	16	–	13,4	5,5	23,7 % der Glucose vergoren. Mit 1 Mol Methylenblau wurden 0,71 Mol Acetylmethylcarbinol erhalten.
Versuch II						
Grundlösung + 50 ccm 4 %ige Glucoselösung + 80 ccm Chinonlösung 1:1000 (allmählich zugesetzt)	5,68–4,64	16	–	4,4	1,3	33,8 % der Glucose vergoren. 75,6 % Chinon reduziert. Mit 1 Mol Chinon wurden 0,18 Mol Acetylmethylcarbinol erhalten.
Versuch III						
Grundlösung + 50 ccm H_2O + 1 ccm Methylenblau 1:500	4,70–4,84 –4,26–4,67	72	–	0	0	Bakteriensuspension reduzierte kein Methylenblau mehr.

Tabelle IV. Grundlösung im Versuch: 100 ccm m/15 KH_2PO_4 + 5 mg $CaCl_2$; 100 ccm Bakteriensuspension, 25 × Verdünnung. Versuchszeit: 22. bis 23. November 1940.

Gärlösung	p_H	Gärzeit Std.	*Voges-Proskauer*	Ni-Dimethylglyoxim auf 100 ccm Gärlösung mg	Acetylmethylcarbinol in % der vergorenen Glucose bzw. Citronensäure	Anmerkungen
Versuch I						
Grundlösung + 100 ccm 2 %ige Glucoselösung	5,45–3,89 –5,62–4,13 –5,72–4,23 –4,06	22	0	0	0	Vergoren 39 % der Glucose.
Versuch II						
Grundlösung + 100 ccm 2 %ige Citronensäurelösung (p_H 7)	5,99–5,52 –5,48–4,60 –4,22–4,30	24	0	0	0	Vergoren 80 % der Citronensäure.
Versuch III						
Grundlösung + 50 ccm 4 %ige Glucoselösung + 65 ccm Methylenblau 1:500 (allmählich zugesetzt)	5,48–4,06 –5,65–4,33 –5,41–4,18 –4,09	23	–	8,2	2,0	Vergoren 39 % der Glucose. Mit 1 Mol Methylenblau wurden 0,43 Mol Acetylmethylcarbinol erhalten.
Versuch IV						
Grundlösung + 50 ccm 4 %ige Citronensäurelösung (p_H 7) + 2 ccm Methylenblau 1:500	5,99–5,55 –5,48–4,26	25	–	0	0	Vergoren 85 % der Citronensäure. Die Gärlösung reduzierte kein Methylenblau.

Zusammenfassung.

Die Aromabakterien bilden Acetylmethylcarbinol aus Glucose in Gegenwart von Methylenblau oder Chinon. Ohne passende Wasserstoffakzeptoren entsteht kein Acetylmethylcarbinol. Aus Citronensäure wird Acetylmethylcarbinol auch in Gegenwart von Methylenblau nicht gebildet. Bei der Rahmsäuerung ist folglich der Zucker die Ausgangssubstanz der Aromastoffe.

Über die Wirkung von Chloroform oder Toluol auf die Katalase der Hefe.

Von

K. Yamafuji, H. Imagawa und **T. Inouye.**

(Aus dem Institut für Biochemie am Kaiserlichen Institut für Zuckerforschung in Tainan, Japan.)

(Eingegangen am 26. November 1940.)

In einer früheren Arbeit haben wir die Aktivierung der Hefekatalase durch Chloroform oder Toluol unter verschiedenen Bedingungen untersucht (1). Wir konnten dabei aber noch kein klares Bild von der Beziehung zwischen der Katalaseaktivierung in der Hefezelle und unserer Theorie der biologischen Hydroperoxydbildung (2) bis (8) erhalten. In der vorliegenden weiteren Untersuchung zur Aufklärung der Wirkungsweise der Narkotica auf die Hefezelle wurde zuerst nachgewiesen, daß zwischen der Atmungsintensität der Hefe vor dem Behandeln mit Chloroform oder Toluol und dem Aktivierungsgrad der Katalase derselben Hefe nach dem Behandeln mit den Narkoticum eine recht enge Beziehung besteht. Wenn die Hefe in Luft mit einem Narkoticum behandelt wurde, so findet eine kräftigere Aktivierung statt, als wenn sie in Stickstoff behandelt wurde. Ob die Hefezelle durch die Narkoticumbehandlung abgetötet wird oder nicht, ist von der Konzentration der Hefesuspension abhängig. Wurde eine stark verdünnte wässerige Hefesuspension kurze Zeit mit Chloroform oder Toluol behandelt, so erfolgte fast keine Vermehrung der Anzahl der toten Zellen. Ferner wurde gefunden, daß die durch Narkotica bewirkte Aktivierung der Hefekatalase durch eine geringe Menge Hämatin noch bedeutend beschleunigt wird. Dieser Befund gibt einen Anhaltspunkt für unsere Annahme, daß im Organismus Sauerstoff durch Eisen zu einer metastabilen Molekülform angeregt wird (8).

I.

In der vorhergehenden Mitteilung wurde gezeigt, daß die Atmung der Hefe nach Behandlung mit Chloroform oder Toluol Null wird (1). Um die Beziehung zwischen der Steigerung der Katalasewirkung durch Narkotica und der Hydroperoxydbildung oder der Sauerstoffaktivierung in der Hefezelle zu klären, muß man noch die Abhängigkeit des Aktivierungsgrades der Katalase von der Atmungsintensität derselben Hefe vor der Narkoticumbehandlung untersuchen. Die Hefe wurde in einer 0,9%igen Natriumchloridlösung aufgenommen und in der

früher mitgeteilten Weise (1) mit Chloroform oder Toluol behandelt, Atmung sowie Katalase wurden ebenfalls nach der schon angegebenen Methode bestimmt (Tabelle I). Für den Vergleich der Atmungsintensität wurden gleiche Mengen von Hefezellen verwendet.

Tabelle I.

Hefe: Saccharomyces cerevisiae. Bei der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs: Versuchsdauer = 1 Stunde, Temperatur = 32°, Gas im Gefäß = Sauerstoff. Bei der Bestimmung der Katalasewirkung: Versuchstemperatur = 0°, p_H = 6,8; die Katalaseaktivität wurde in $k \cdot 10^4$ ausgedrückt.

Nährboden	Kulturdauer in Tagen	Hefe vor Behandlung mit dem Narkoticum	Hefe nach Behandlung		
			mit Wasser	mit Chloroform	mit Toluol
		Sauerstoffverbrauch in cmm	Relative Katalaseaktivität		
Zuckerrohrsaft-Agar	7	153	100	1250	368
	10	119	100	864	417
Zuckerrohrsaft	7	31	100	444	133
	11	17	100	198	143

Im allgemeinen findet die Aktivierung der Katalase durch Narkotica bei einer stark atmenden Hefezelle kräftiger statt als bei einer schwach atmenden. Insbesondere ist die durch Chloroform bewirkte Steigerung der Katalasewirkung der Atmungsintensität der intakten Hefe ungefähr proportional. Aus Tabelle I geht auch hervor, daß die in einer Nährlösung gewachsene Hefe eine schwächere Atmungsfähigkeit besitzt als die auf einem festen Nährboden gewachsene und daß sie dementsprechend auch eine geringere Katalaseaktivierung zeigt.

Nach den Versuchen in Tabelle I scheint Sauerstoff bei der Aktivierung der Katalase in der Hefezelle durch Chloroform oder Toluol eine wichtige Rolle zu spielen. Um diese Annahme zu bestätigen, muß geprüft werden, ob eine Katalaseaktivierung durch Narkotica auch in Stickstoff stattfindet. In ein nach dem früher beschriebenen Verfahren (1) hergestelltes Gemisch von Hefesuspension und Chloroform oder Toluol wurde 5 Minuten Stickstoff bzw. Luft eingeleitet, hierauf das die Mischung enthaltende Proberöhrchen verschlossen, gut durchgeschüttelt und dann in der üblichen Weise die Katalase bestimmt.

Tabelle II.

Hefe: Saccharomyces cerevisiae. Behandlungsdauer: 1 Stunde.

	Ohne Narkoticum Luft	Mit Chloroform Stickstoff	Mit Chloroform Luft	Ohne Narkoticum Luft	Mit Toluol Stickstoff	Mit Toluol Luft
Katalaseaktivität in $k \cdot 10^4$	3,57	6,72	12,04	9,18	20,27	38,71
Relative k ...	100	188	337	100	222	422

Wie aus Tabelle II ersichtlich, ist der Steigerungsgrad der Katalaseaktivität bei der in Luft behandelten Hefe viel höher als bei Anwendung von Stickstoff. Selbstverständlich kann unter diesen Versuchsbedingungen der Sauerstoff nicht vollständig ausgeschlossen werden. Der Sauerstoff wirkt vielleicht zusammen mit den Narkotica auf die Hefekatalase aktivierend, bevor er durch Stickstoff vollkommen vertrieben wird.

In der vorigen Mitteilung haben wir berichtet, daß es Heferassen gibt, deren Katalase durch Chloroform oder Toluol nicht aktiviert wird (1). In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, daß bei den Rassen, deren Katalasewirkung gewöhnlich durch diese beiden Narkotica bedeutend gesteigert wird (z. B. Saccharomyces cerevisiae), selten eine Hemmung der Katalase durch dieselben Narkotica erfolgt. Diese Erscheinung wurde nur dann beobachtet, wenn zur Untersuchung eine unter ungünstigen Umständen gezüchtete Hefe benutzt wurde, deren Atmung bereits vor dem Behandeln mit dem Narkoticum sehr schwach war. Die Atmungsintensität der Hefe wird im allgemeinen mit der Kulturdauer allmählich geringer. Aus diesen Versuchen und Beobachtungen können wir schließen, daß zwischen der Atmungsfähigkeit und der Katalaseaktivierung durch Narkotica eine enge Beziehung besteht.

II.

Bei Herstellung von Enzympräparaten aus Hefezellen werden bekanntlich Chloroform und Toluol benutzt, um die Zellen abzutöten. Wir hatten aber gefunden, daß unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen sich die Zahl der toten Zellen bei der Behandlung der Hefesuspension mit diesen Narkotica fast nicht vermehrt (1). Wir nahmen an, daß dieses gegensätzliche Verhalten auf eine verschiedene Behandlungsweise zurückzuführen sei. Deshalb wurde zunächst eine Mischung von 5 ccm einer frisch bereiteten wässerigen Hefesuspension und 3 ccm Narkoticum einerseits wiederholt geschüttelt, andererseits ohne Schütteln stehen gelassen und nach einer Stunde die Zahl der toten Hefezellen wie früher (1) nach der Methylenblaumethode ermittelt (Tabelle III).

Tabelle III.

Hefe: Saccharomyces batta. Versuchstemperatur: 30°.

	Chloroform		Toluol	
	Geschüttelt	Ohne Schütteln	Geschüttelt	Ohne Schütteln
Tote Zellen in %	16,0	15,5	14,6	14,9

Das Schütteln der Hefesuspension mit den Narkotica übt auf den Zelltod fast keinen Einfluß aus.

Es wäre aber möglich, daß die einmal mit Chloroform oder Toluol behandelte Hefe nach Entfernung des Narkoticums ihre Lebensfähigkeit allmählich verliert. Zur Prüfung dieser Annahme wurde die in einer 0,9%igen Natriumchloridlösung suspendierte Hefe wie oben mit den Narkotica behandelt, die Suspension nach einer Stunde zentrifugiert und dann die Hefe wieder in einer physiologischen Kochsalzlösung aufgenommen. Die Zahl der toten Zellen in dieser Suspension wurde täglich bestimmt.

Tabelle IV.

Hefe: Saccharomyces cerevisiae. Versuchstemperatur: 32°.

Tage	Tote Zellen in %		Tage	Tote Zellen in %	
	ohne Chloroform	mit Chloroform		ohne Toluol	mit Toluol
1	17,8	17,9	3	20,1	20,8
2	17,9	18,1	4	19,8	20,4
3	19,1	19,0	5	21,5	21,9
4	19,4	19,8			
5	20,2	20,6			

Aus Tabelle IV geht hervor, daß Chloroform und Toluol auf das Leben der Hefezelle keine Nachwirkung auszuüben scheinen.

Diese Versuchsergebnisse führten uns zu der Vermutung, daß das ungleiche Verhalten der Hefe durch Konzentrationsunterschiede bei den benutzten Hefesuspensionen erklärt werden könnte. In der Tat wird bei der Darstellung der Hefeenzyme gewöhnlich eine sehr konzentrierte Hefesuspension verwendet. Wir haben aber in der vorhergehenden (1) sowie der vorliegenden Untersuchung zur frischen Hefe stets die 150 bis 200fache Menge Wasser zugesetzt und diese so verdünnte Suspension mit Narkotica behandelt. Für diesen Versuch wurde nunmehr zur Bereitung einer konzentrierten Hefesuspension die Hefemasse nur mit der gleichen Menge Wasser versetzt, andererseits wurde in der üblichen Weise eine verdünnte Hefesuspension hergestellt. Die beiden Suspensionen wurden dann eine Stunde mit Chloroform oder Toluol behandelt (Tabelle V).

Tabelle V.

Hefe: Saccharomyces batta. Kulturdauer: 10 Tage.

	Chloroform		Toluol	
	Konzentrierte Hefesuspension	Verdünnte Hefesuspension	Konzentrierte Hefesuspension	Verdünnte Hefesuspension
Tote Zellen in %	43,3	20,5	31,8	19,7

Wenn eine genügend konzentrierte Hefesuspension mit Narkotica behandelt und dabei eine Emulsion gebildet wurde, so erfolgt Zelltod.

Bei den bisherigen Versuchen wurde die Zahl der toten Zellen mit Hilfe der Methylenblaumethode ermittelt. Zu untersuchen blieb, ob nicht durch das von uns gewöhnlich benutzte Behandlungsverfahren auch die Fortpflanzungsfähigkeit der Hefe leidet. Aus der *Koji*-Agarkultur wurde eine verdünnte Hefesuspension hergestellt und in der üblichen Weise mit Chloroform oder Toluol behandelt. Nach dem Zentrifugieren wurden die Hefezellen wieder in sterilisiertem Wasser aufgenommen, auf einer Agarplatte gezüchtet und nach einigen Tagen die entstandenen Kolonien gezählt (Tabelle VI).

Tabelle VI.

Hefe: Saccharomyces cerevisiae. Kulturtemperatur: 32°.

	Mit Chloroform behandelt	Unbehandelt	Mit Toluol behandelt	Unbehandelt
Zahl der Kolonien ...	117	112	120	118

Durch diese Versuche konnten wir einwandfrei feststellen, daß unter den von uns gewählten Behandlungsbedingungen Chloroform und Toluol auf den Tod der Hefezellen in der so verdünnten Suspension fast keine Wirkung ausüben.

Da die Aktivierung der Hefekatalase durch Narkotica zu der Atmungsfähigkeit der Hefe in einer engen Beziehung steht und ohne erkennbaren Zelltod erfolgt, so ist zu erwarten, daß sie durch Zusatz einer geringen Menge von Eisenporphyrinverbindungen beeinflußt wird. Daß Eisen in der lebenden Zelle bei den biologischen Oxydationsvorgängen eine wesentliche Rolle spielt, ist durch die Untersuchungen von *Warburg* u. a. zweifellos erwiesen. 3 ccm Hefesuspension wurden mit 0,2 mg Hämatin, welches in einer geringen Menge n/10 Natriumhydroxyd gelöst war, und mit 2 ccm Phosphatpuffer von $p_H = 6{,}8$ versetzt und dann mit Chloroform oder Toluol behandelt. Hierbei muß zur vollständigen Entfernung des Hämatins die Suspension vor der Katalasebestimmung wiederholt zentrifugiert werden.

Tabelle VII.

Hefe: Saccharomyces cerevisiae. Behandlungsdauer: 1 Stunde.

	Relative Kataseaktivität			
	unbehandelt	behandelt mit Hämatin allein	behandelt mit Narkoticum allein	behandelt mit Hämatin und Narkoticum
Chloroform .	100	86	805	1043
Toluol	100	82	115	132

Trotzdem die Katalasewirkung der Hefe, wie Tabelle VII zeigt, durch Hämatin allein etwas gehemmt wird, wirkt das Hämatin auf die Aktivierung der Hefekatalase durch Narkotica beschleunigend.

Zusammenfassung.

Wir konnten in der vorliegenden Arbeit nachweisen, daß die Steigerung der Katalasewirkung durch Narkotica der Atmungsintensität der Hefe vor der Behandlung beinahe proportional ist und daß die Katalaseaktivierung in Luft stärker erfolgt als in Stickstoff. Die Atmungsfähigkeit der Hefe wird, wie wir früher berichtet haben (1), durch Behandlung mit Chloroform oder Toluol bedeutend gestört, trotzdem dabei die Zelle durch die Narkotica nicht getötet wird. Auf Grund dieser Befunde nehmen wir an, daß die Narkotica zusammen mit dem Sauerstoff auf die Hefekatalase aktivierend wirken, bevor die sauerstoffabsorbierende Fähigkeit der Hefezelle völlig verloren wird.

In einer früheren Arbeit wurde mitgeteilt, daß die Katalase in der Hefezelle sowie im Seidenraupenei durch Wasserstoffperoxyd aktiviert wird (9). Unserer Meinung nach wird die Hydroperoxydbildung in der lebenden Zelle in den meisten Fällen durch aktiven molekularen Sauerstoff hervorgebracht (7, 8). Daß der Sauerstoff sowohl durch Lichtstrahlen und feste Grenzflächen als auch durch biologische eisenhaltige Substanzen, wie Hämoglobin, zu einer metastabilen Form angeregt wird, ist aus einer Reihe unserer Untersuchungen ersichtlich. Es ist also möglich, daß eine der Ursachen einer Steigerung der Katalasewirkung der Hefe durch Chloroform oder Toluol darin zu suchen ist, daß Sauerstoff durch die Grenzflächen beider Flüssigkeiten (Wasser und Narkoticum) aktiviert und dadurch eine Hydroperoxydbildung befördert wird. Ferner kann die Wirkung des Hämatins zum Teil ebenfalls dadurch erklärt werden, daß Sauerstoff durch diese Eisenverbindung zu einem aktiven Molekularzustand angeregt wird, wobei durch die verstärkte Bildung von Wasserstoffperoxyd die Aktivierung der Katalase in der Hefezelle durch Narkotica noch mehr beschleunigt wird.

Literatur.

1) *K. Yamafuji, H. Imagawa* u. *S. Suzuki*, diese Zeitschr. **304**, 266, 1940. — 2) *K. Yamafuji, M. Fujii* u. *M. Nishioeda*, ebenda **296**, 348, 1938. — 3) *K. Yamafuji, M. Nishioeda* u. *K. So*, ebenda **298**, 293, 1938. — 4) *K. Yamafuji, K. So* u. *H. Tin*, ebenda **300**, 414, 1939. — 5) *K. Yamafuji, M. Nishioeda* u. *R. Ryushi*, ebenda **303**, 260, 1939. — 6) *K. Yamafuji* u. *M. Nishioeda*, ebenda **304**, 160, 1940. — 7) *K. Yamafuji* u. *K. So*, ebenda **305**, 354, 1940. — 8) *K. Yamafuji* u. *H. Imagawa*, ebenda **306**, 24, 1940. — 9) *K. Yamafuji*, ebenda **288**, 165, 1936.

Muskelkontraktion und Löslichkeit der Muskeleiweißkörper*.

Von

Friedrich Kamp.

(Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Münster und dem Physiologischen Institut Königsberg.)

(Eingegangen am 4. Dezember 1940.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Allgemeiner Teil.

I.

Die doppelbrechenden Abschnitte des Skelettmuskels bestehen anscheinend ausschließlich aus achsenparallel angeordneten Fadenmolekeln des Myosins[1]. Ihre Zahl im qmm Querschnitt der doppelbrechenden Abschnitte ist von der Größenordnung 300 Milliarden[2]. Durch einen sonst unbekannten, aber frühen Teilabschnitt des anaeroben Betriebsstoffwechsels wird eine Verkürzung dieser Struktur bewirkt. Die Muskelkontraktion ist also ein kolloidaler Vorgang, der durch den Arbeitsstoffwechsel bewirkt wird. Dieser Vorgang ist glatt reversibel. Er ist infolge seiner Geschwindigkeit und infolge des komplizierten Baues des Gesamtmuskels in seinem Mechanismus zur Zeit nicht näher analysierbar.

Im Jahre 1930 entdeckte *H. J. Deuticke*[3], daß das Eiweiß ausgeschnittener Froschmuskeln in bestimmten Salzlösungen von $p_H \backsim 7{,}0$ fast genau in dem Maße unlöslicher wird, in dem die Muskeln vorher anaerob Arbeit geleistet haben. Ein mehrstündiger Aufenthalt solcher Arbeitsmuskeln in Sauerstoff von 1 Atm. Druck hebt diese Löslichkeitsminderung auf[4]. Doch wird bei solcher Behandlung auch der Ruhemuskel in seiner Löslichkeit gesteigert, also löslicher als normal. Der *Deuticke*-Effekt ist eine kolloidale Änderung des Muskels, die durch den Arbeitsstoffwechsel bewirkt wird. Es ist unbekannt, ob diese Änderung am Myosin stattfindet und ob sie auf einer „frühen" Reaktion des anaeroben Betriebsstoffwechsels beruht. Es ist nicht ganz sicher, ob der Effekt einfach und glatt reversibel ist. Bestimmt ist er aber

---

* (D 6.) Die vorliegenden Untersuchungen wurden auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. *H. H. Weber* ausgeführt.

[1] *H. H. Weber*, Ergebnisse der Physiol. usw. **36**, 109, 1934. — [2] *Derselbe*, Naturwiss. **27**, 33, 1939. — [3] Pflügers Arch. **224**, 1, 1930; *J. Hensay*, ebenda **224**, 44, 1930. — [4] *H. J. Deuticke*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **210**, 97, 1932.

grundsätzlich einer Analyse seines Mechanismus zugänglich. In den folgenden Abschnitten wird gezeigt, daß die Kontraktion und die Reaktion, auf der der *Deuticke*-Effekt beruht, bedingungsgleich zu sein scheinen.

II.

Wird einem narkotisierten Kaninchen ein Hinterbein entnervt und an dessen art. cruralis eine Klemme gelegt, so kann dies Bein nach Belieben aus dem Kreislauf aus- und wieder eingeschaltet werden. Wird der calcaneus dieses Beines nach Durchschneidung der antagonistischen Extensoren am Spannungshebel befestigt, so erhält man allein die Spannungsleistung der Peronaeus-Tricepsgruppe. Wenn diese Muskelgruppe bei aufgehobener Durchblutung auf elektrischen Reiz so lange gearbeitet hat, bis ihre maximale Spannungsleistung nur noch 15% der Anfangsspannung beträgt (d. i. im Durchschnitt 0,3 bis 0,4 kg), so erholt sich der Muskel in Ruhe und bei Einschaltung des Blutkreislaufes wieder. Seine Leistung beträgt nach 90 Sekunden etwa 60%, nach 5 Minuten etwa 80% und nach 20 Minuten 90 bis 100% der Anfangsspannung (Abb. 1). Nach einer Ermüdung auf nur 20% der Anfangs-

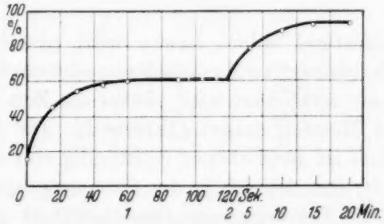

Abb. 1. Kurve der aeroben Erholung. Ordinate: Spannung in % der Spannung vor der Ermüdung, Abszisse: Zeit.

spannung verläuft die Erholung schneller. Also ist die Zustandsänderung, die die Spannungsleistung bei solcher Arbeitsleistung bestimmt, vollständig reversibel

Die Löslichkeit der Muskeleiweißkörper in einer Lösung von $3{,}7 \cdot 10^{-1}$ μ und p_H 7,5 ist nach Absinken der Spannungsleistung auf 40% der Anfangsspannung noch unverändert. Nach Abfall der Spannungsleistung auf 20% ist die Löslichkeit um etwa 3%, nach Abfall auf 15% der ursprünglichen Spannung um 10 bis 12% des Gesamtmuskel-N vermindert. Bei der Erholung auf 50% der Anfangsspannung, d. h. nach 90 Sekunden Erholungszeit, ist die Löslichkeit nur noch um etwa 2% herabgesetzt. Bei vollständiger Erholung der Spannungsleistung ist auch die Kolloidlöslichkeit wieder vollständig erholt. Es ist für das Ergebnis gleichgültig, ob der Muskel in dem

Tabelle I. Änderung der Muskelkolloide durch Ermüdung und ihre Reversibilität.

Zahl des Versuchs	Art der Zerkleinerung	Spannungsrest: Spann. ermüdet / Spann. unerm. %	Gelöster N / Gesamt-N: a ermüdet %	b unerm. %	Unterschied a–b %	Tier
1	Flüssige Luft	15	41,2	51,1	– 9,9	Kaninchen
6	Mastikator	15	43,8	55,2	– 11,8	
2	„	20	55,3	58,3	– 3	
1	„	40	59,4	59,8	– 0,4	Frosch
1	„	50	65,7	65,4	+ 0,3	

Zahl des Versuchs	Ermüdungsgrad: Spann. ermüdet / Spann. unerm. %	Erholungsgrad: Spann. erholt / Spann. unerm. %	Gelöster N / Gesamt-N: a erholt %	b unerm. %	Unterschied a–b %	Tier
1	15	95	58,5	59,1	– 0,6	Kaninchen
2	15	80	57,4	59,2	– 1,8	
3	15	50	57,8	60,1	– 2,3	

jeweiligen Kolloidzustand sofort fixiert wird (durch Versenken in flüssige Luft und Zerkleinern zu Muskelschnee) oder nur herausgenommen und in der Maschine zerkleinert wird, wobei die Zeit bis zum Beginn der Extraktion 15 Minuten dauert (Tabelle I). Die Kolloidänderung des *Deuticke*-Effektes ist *aerob* ebenso vollständig und sauber reversibel wie die Kolloidänderung, die sich in der Spannungsleistung ausdrückt. Allerdings scheint die Erholung vom *Deuticke*-Effekt der Erholung der Spannungsleistung etwas nachzuhinken.

Wird ein Muskel sofort nach Erholung von erschöpfender Arbeit von neuem gereizt, so ermüdet die Spannungsleistung der Kolloide schneller als beim ersten Mal (Abb. 3). Noch schneller als die Spannungsleistung aber sinkt anscheinend die Kolloidlöslichkeit. So ist die Eiweißlöslichkeit bei einem Spannungsrest von 15 % nach der ersten Ermüdungsperiode um etwa 4 %, nach der zweiten Periode um etwa 10 % erniedrigt (Tabelle IV).

III.

Der *Deuticke*-Effekt tritt erst bei Ermüdung des Muskels auf und ist nur *aerob* reversibel. Er gleicht darin dem Verkürzungsrückstand der Kontraktion. Wir fragen: Ist auch der *Deuticke*-Effekt vielleicht nur der Ermüdungsrückstand einer Kolloidreaktion, die — wie die Kontraktion selbst — bei *jeder* Zuckung auftritt und sofort *anaerob* wieder rückgängig gemacht wird.

Es ist schon länger bekannt[1], daß die Kolloidlöslichkeit des *Ruhe*muskels durch Monojodacetat-Vergiftung stark abnimmt. Wir zeigen nun (Tabelle II und III), daß das nicht auf einer Kolloidwirksamkeit des Jodacetats beruht, sondern auf seiner bekannten Stoffwechselwirkung: Wird ein entnervter Ruhemuskel eines vergifteten Tieres mit flüssiger Luft getötet, so erfolgt immer ein kräftiger, kurzer Tetanus mit sehr beträchtlicher Minderung der Eiweißlöslichkeit. Wird der Muskel zunächst in Luft von etwa -5 bis -10^0 C gefroren, so kontrahiert er sich wenig oder gar nicht und die Löslichkeitsminderung wird sehr klein oder bleibt aus (Tabelle II).

Tabelle II. Jodacetatwirkung und Kältekontraktur.

Vorbehandlung des lebenden Muskels	Dauer Min.	Millimol Gift / g Frosch	Tötung des Muskels	Eigenschaften des Extraktes: p_H	gelöster N / Gesamt-N %	Unterschied %
Jodacetat	150	$1{,}5 \cdot 10^{-4}$	Flüssige Luft	7,46	51,8	— 19,9
Unvergiftet	—	—	„ „	7,2	71,7	
Jodacetat	150	$1{,}5 \cdot 10^{-4}$	„ „	7,46	50,9	— 17,6
Unvergiftet	—	—	„ „	7.2	68,5	
Jodacetat	15	$3 \cdot 10^{-3}$	Luft -5^0 C	—	42,6	— 0,7
Unvergiftet	—	—	„ -5^0 C	—	43,3	
Jodacetat	120	$3 \cdot 10^{-3}$	„ -7^0 C	—	44,8	— 3,6
Unvergiftet	—	—	„ -7^0 C	—	48,4	
Jodacetat	60	$3 \cdot 10^{-3}$	„ -7^0 C	—	45,4	— 5,5
Unvergiftet	—	—	„ -7^0 C	—	51	

Tabelle III. Eiweißlöslichkeit und Jodacetatgehalt von 0,37 μ K-Phosphatextrakten (p_H 7,6, Frosch).

Jodacetatgehalt	Löslicher N / Gesamt-N %	Jodacetatgehalt	Löslicher N / Gesamt-N %
—	39,6	—	55,6
$2 \cdot 10^{-4}$ m	40,2	$1 \cdot 10^{-4}$ m	54,2
$2 \cdot 10^{-3}$ m	39,2	$2 \cdot 10^{-4}$ m	55,1
$4 \cdot 10^{-3}$ m	40,0	$1 \cdot 10^{-3}$ m	54,1

Wird das Gift nicht dem Tier gegeben, sondern unmittelbar der Extraktionslösung zugefügt, so beeinflußt es die Eiweißlöslichkeit überhaupt nicht (Tabelle III).

Also wirkt das Jodacetat allein über den Arbeitsstoffwechsel: Durch die Vergiftung der Milchsäurebildung wird der Muskel empfindlicher gegen Arbeit, so daß ein kurzer Tetanus — etwa beim Versenken

[1] *G. Embden* u. *E. Metz*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **192**, 233, 1930.

in flüssige Luft — bereits aus dem „Ruhe"-Muskel einen weitgehend unlöslichen „Arbeits"-Muskel macht. Mit anderen Worten: im *unvergifteten* Muskel *verzögert* die Milchsäurebildung den *Deuticke*-Effekt. Da aber die Milchsäurebildung das letzte Glied der anaeroben Reaktionskette ist, kann sie das nur, indem sie normalerweise die löslichkeitsmindernde Kolloidreaktion — wahrscheinlich mittelbar — rückgängig macht. Die *Deuticke*-spezifische Reaktion des Eiweißes liegt *vor* der Milchsäurebildung. Der *Deuticke*-Effekt des unvergifteten Muskels ist ein „Ermüdungsrückstand" dieser frühen Löslichkeitsänderung. Da aber auch alle anderen anaeroben Betriebsstoffe des Muskels und ihre physiologischen Umwandlungsprodukte auf die Eiweißlöslichkeit wirkungslos sind[1], dürfte diese Reaktion und ihre Reversion vor Beginn der ganzen Kette bisher bekannter Betriebsreaktionen des Muskels liegen — wie auch die Kontraktion[2]!

IV.

Die Löslichkeitsabnahme des Muskeleiweißes mit der Ermüdung, die Löslichkeitszunahme mit der Erholung ist allein Änderung der

Tabelle IV. Kolloidänderung = Myosinänderung (Kaninchen).

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Zahl der Ermüdungsperioden	N-Gehalt des Muskels in Millimol / g	Leistungsrest Spann. ermüdet / Spann. unerm. %	Gelöster N / Gesamt-N: Extrakt-N %	Rest-N %	Glob. X + Myogen-N %	Myosin-N %	Unterschied ermüdet – unermüdet: Extrakt %	Myosin %
1	2,50	20	46,5	12,2	20,1	15,6	– 0,3	0
	2,52	100	46,8	12,6	20,0	15,6		
1	2,71	15	56,6	13,2	22,8	18,8	– 3,5	– 3,45
	2,74	100	60,1	13,4	23,5	22,25		
2	2,29	15	50	12,9	21,7	14,55	– 8,2	– 8,85
	2,58	100	58,2	12,6	21,5	23,4		
2	2,25	15	42	13,0	[24,6]	4,45	– 17,5	– 17,85
	2,73	100	59,5	12,7	[24,7]	22,3		
2	2,31	15	41,7	12,7	21,2	[7,8]	– 17,3	– 17,55
	2,63	100	59,0	12,8	20,85	[25,35]		

Anmerkung 1. Bei zwei Ermüdungsperioden ist der Leistungsrest am Schluß beider Perioden gleich. Dazwischen hat sich der Muskel auf 90 bis 100 % der Anfangsspannung erholt.

Anmerkung 2. Die Zahlen in den Klammern sind nicht unmittelbar, sondern durch Differenzbildung bestimmt.

[1] Diese Versuche werden später in dieser Zeitschrift durch *F. Vogel* veröffentlicht werden. — [2] *Deuticke* macht durch sogenannte Tempoversuche sehr wahrscheinlich (a. a. O.), daß zwischen der ersten und der

Myosinlöslichkeit (Tabelle IV, Spalte VIII und XI). Oft ist bei einem Spannungsabfall auf 15% der Anfangsleistung nur noch $^1/_4$ bis $^1/_5$ der Myosinmenge löslich, die aus dem frischen Vergleichsmuskel extrahiert wird (vgl. die letzten zwei Versuche der Tabelle IV). Rest-N, Myogen und Globulin X werden durch Arbeit, Ermüdung und Erholung überhaupt nicht beeinflußt (vgl. Tabelle IV, Spalte V und VI). Wie die Muskelkontraktion ist auch der *Deuticke*-Effekt eine reversible Zustandsänderung *allein* des Muskeleiweißkörpers *Myosin*.

V.

Auch alternder Muskelbrei wird weniger löslich (*Deuticke*[1]). Auch diese Löslichkeitsabnahme ist eine Löslichkeitsabnahme des Myosins (*Meyer-Weber*[2]). Löslichkeitsabnahme durch Ermüdung und Alterung

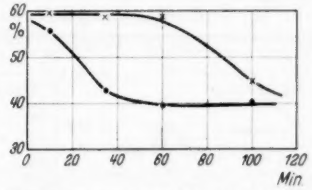

Abb. 2. Vergleich der Alterung eines ermüdeten Muskelbreies (· – · – ·) und eines unermüdeten Breies (× – × – ×) bei 22° C. Ordinate: löslicher N/Gesamt-N in %; Abszisse: Zeit.

können sich gegenseitig vertreten: Wird ein Muskel nur gerade bis zur Grenze des Kolloideffektes ermüdet, so tritt der Alterungseffekt statt nach 1 Stunde sofort ein (Abb. 2). Die unvollständige Ermüdung vertritt 1 Stunde der Alterung. Die Löslichkeitsabnahme durch Alterung und durch Ermüdung scheint wesensgleich zu sein.

VI.

Der *Deuticke*-Effekt beruht nicht auf verschiedenem Gehalt der Extrakte an den bisher bekannten Ionen des Stoffwechsels. Denn die ionalen Änderungen durch den anaeroben Betriebsstoffwechsel kommen im Extrakt nicht mehr zur Geltung: Bei den gegebenen Mischungs- und Konzentrationsverhältnissen stammen 90% der Ionen des Extraktionssystems aus der stark gepufferten Extraktionslösung und nur etwa

achten Sekunde nach einer Zuckung keine Reversion der Löslichkeitsänderung stattfindet. Er schließt daraus, daß die Löslichkeitsänderung anaerob überhaupt nicht rückgängig gemacht werden kann. Die Analyse der Jodacetatwirkung macht es wahrscheinlicher, daß sie bereits vor Ablauf der ersten Sekunde bis auf den Ermüdungsrückstand rückgängig gemacht ist.

[1] Pflügers Arch. **224**, 1 u. 44, 1930. — [2] Diese Zeitschr. **266**, 137, 1933.

10% aus den Muskelproben. Tatsächlich sind Leitfähigkeit und p_H der „frischen" und der „beeinflußten" Extrakte gleich.

Es käme also die abweichende Ionalität bei Ermüdung oder Alterung ausschließlich als löslichkeitsändernde Vorgeschichte der Extraktion in Betracht. Diese Vorgeschichte kann aber ebenfalls am *Deuticke*-Effekt nicht schuld sein: Die Beseitigung der besonderen Ionalität ermüdeter Muskeln durch Erholung hebt den Effekt auf, die Beseitigung durch die Extraktionslösung aber tut das nicht, obwohl die Vorgeschichte in beiden Fällen die gleiche ist.

Während der Alterung ist die Konzentration der kolloidwirksamen Ionen — insbesondere der H^+ — künstlich leicht zu variieren. Die Löslichkeitsminderung erweist sich dabei zwischen $p_H \sim 5{,}5$ und 7,0 über 4 Stunden als völlig unabhängig vom p_H, falls nur die $[H^+]$ während

Versuch 1. p_H und Alterungseffekt (20° C).

1	2	3	4	5	6	7
Bedingungen der Alterung				Eigenschaften des Extraktes		
Zusätze	Dauer Std.	Brei / Brei + Zusatz	p_H	$\varkappa$	p_H	Gelöster N / Gesamt-N %
frisch				$1{,}58 \cdot 10^{-2}$	7,27	65,0
„				$1{,}84 \cdot 10^{-2}$	7,23	64,3
Keiner	1	1,0	5,5	$1{,}64 \cdot 10^{-2}$	7,30	49,4
3 ccm 0,37 μ KCl*	1	0,50	6,2	$1{,}88 \cdot 10^{-2}$	7,28	51,3
3 „ 0,37 μ K-Phosphat*	1	0,55	6,9	$1{,}64 \cdot 10^{-2}$	7,32	50,1
Keiner	2	1,0	5,5	$1{,}63 \cdot 10^{-2}$	7,37	43,1
3 ccm 0,37 μ KCl	2	0,49	6,2	$1{,}89 \cdot 10^{-2}$	7,30	46,2
3 „ 0,37 μ K-Phosphat	2	0,49	6,9	$1{,}63 \cdot 10^{-2}$	7,33	45,6
Keiner	4	1,0	5,5	$1{,}66 \cdot 10^{-2}$	7,31	44,5
3 ccm 0,37 μ KCl	4	0,51	6,3	$1{,}89 \cdot 10^{-2}$	7,28	48,1
3 „ 0,37 μ K-Phosphat	4	0,50	7,0	$1{,}66 \cdot 10^{-2}$	7,33	45,6

* 0,37 μ = 0,133 mol. Phosphat p_H 7,6 = 0,37 mol. KCl.

Versuch 2. Alterung und Ionenstärke (20°, Kaninchen).

1	2	3	4	5	6
Bedingungen der Alterung			Eigenschaften des Extraktes		
Zusätze	Dauer Std.	Brei / Brei + Zusatz	p_H	Brei / Brei + Flüssigkeit	Löslicher N / Gesamt-N %
frisch			7,18	0,157	61,7
Keiner	1	1	7,15	0,164	58,8
3 ccm 0,37 K-Phosphat	3	0,55	7,18	0,153	44,7
3 „ H_2O	3	0,56	7,20	0,164	44,1
Keiner	3	1	7,32	0,162	46,9
Keiner	7	1	7,22	0,158	41,3

der Extraktion selbst in allen Proben gleich ist (vgl. Versuch 1, Spalte 4 und 7). Ähnliches gilt für eine Verdünnung der Ionenstärke — durch Wasserzusatz — auf etwa die Hälfte (s. Versuch 2, Spalte 3 und 6).

Sowohl bei Arbeit wie nach Zerschneidung ändert sich der Ionenbestand des Muskels von Anfang an. Die Kolloidänderung dagegen fehlt gerade anfangs und wächst im Schlußstadium der betreffenden Stoffwechselprozesse sehr rasch: Die Löslichkeitsabnahme des Myosins beginnt bei der Ermüdung erst bei 20 % der ursprünglichen Spannungsleistung (Tabelle I), bei der Alterung — bei 20° C — erst nach etwa 1 Stunde (vgl. Abb. 1 und Tabelle V); bei 10 bis 15 % Spannungsleistung aber oder $1^1/_2$ Stunden Alterung ist das Myosin bereits fast völlig unlöslich (s. Tabelle IV, Tabelle V und vgl. Abb. 1) [1].

Tabelle V. Zeitablauf der Alterung des Muskelbreies.

Löslicher N/Gesamt-N				Temperatur
frisch %	1 Std. gealtert %	$^3/_2$ Std. gealtert %	2 Std. gealtert %	° C
61,7	58,5	—	—	20
59,4	58,5	44,5	—	20
65,0	49,4	—	43,1	20
61,9	44,8	—	40,6	22
55,0	35,7	—	34,9	26

Kolloid- und Ionenänderungen gehen auch *spontan* im Muskel keineswegs parallel. — Der *Deuticke*-Effekt beruht offenbar auf einer *spezifischen* Reaktion des Myosins.

VII.

Was für eine Reaktion des Myosins das ist, ist zur Zeit noch nicht bekannt. Eine Möglichkeit zukünftiger Aufklärung mag in der eigenartigen Empfindlichkeit der Reaktion gegen eine Verdünnung des Muskels mit unspezifischen Lösungen gegeben sein.

Trotz der relativen Unabhängigkeit der Kolloidalterung von Verschiedenheiten des Ionenmilieus bleibt die Alterung über mehrere Stunden bei 20° C ganz aus, wenn der Brei mit dem sechs- bis neunfachen Volumen eines leicht hypertonischen (0,133 mol., p_H 7,6) Phosphatpuffers verdünnt ist (Versuch 3). Es ist gleichgültig, ob der Muskelbrei dabei in der Eiweiß-

[1] In den Versuchen von *Deuticke* (Zeitschr. f. physiol. Chem. **210**, 97, 1932) scheint der Effekt schon bei wesentlich geringerer Ermüdung aufzutreten. Das mag darauf beruhen, daß er mit ausgeschnittenen Muskeln gearbeitet hat: Die Reaktion, die dem Effekt zugrunde liegt, ist nämlich auch anaerob weitgehend reversibel (vgl. III). Die Bedingungen anaerober Erholung sind aber im vegetativ versorgten Muskel des lebendes Tieres besser (vgl. Experimentellen Teil, Abschnitt 2). Also sollte ein Ermüdungsrückstand an Minderlöslichkeit im ausgeschnittenen Muskel früher auftreten.

Versuch 3. Aufhebung des Alterungseffektes durch Verdünnung.

Spalte	Kaninchenmuskelbrei wird mit Phosphat geschüttelt	$\varkappa$	p_H	Brei / Brei + Phosphat	Gelöster N / Gesamt-N %
1	2 Std. bei 0° C	$1{,}57 \cdot 10^{-2}$	7,40	0,131	61,4
2	2 Std. bei 0° C + 2 Std. bei 20° C	$1{,}56 \cdot 10^{-2}$	7,40	0,153	61,0
3	2 Std. bei 0° C + 4½ Std. bei 20° C	$1{,}61 \cdot 10^{-2}$	7,37	0,123	59,9
4	2 Std. bei 20° C	$1{,}60 \cdot 10^{-2}$	7,40	0,113	60,1
5	2 Std. bei 0° C, dann Abzentrifugieren des Breies + 2 Std. bei 20° C	$1{,}58 \cdot 10^{-2}$	7,40	0,153	60,8
6	2 Std. bei 0° C, dann Abzentrifugieren des Breies + 4½ Std. bei 20° C ...	$1{,}58 \cdot 10^{-2}$	7,40	0,124	60,7

Tabelle VI.

Verzögerung des Alterungseffektes durch Verdünnung.

Der Brei hat vor der Extraktion gestanden mit						Eigenschaften des Extraktes		
Zusätze	Dauer Std.	Temperatur °C	$\varkappa$*	Brei / Brei + Zusatz	p_H	p_H	Brei / Brei + Extr.	Gelöster N / Gesamt-N %
Sofort extrahiert						7,3*	0,143	61,9
Keiner	1	22	$1{,}3 \cdot 10^{-2}$	1,0	5,7	—	0,137	44,8
2,5 ccm 0,3, 0,37 μ K-Phosphat	1	22	$1{,}6 \cdot 10^{-2}$	0,53	6,9	—	0,123	55,0
5 ccm Phosphat	1	22	$1{,}7 \cdot 10^{-2}$	0,38	7,05	—	0,131	51,7
Keiner	2	22	$1{,}3 \cdot 10^{-2}$	1,0	5,7	—	0,119	40,6
2,5 ccm Phosphat	2	22	$1{,}6 \cdot 10^{-2}$	0,55	6,9	—	0,121	48,4
5 ccm Phosphat	2	22	$1{,}7 \cdot 10^{-2}$	0,40	7,05	—	0,143	49,1
Sofort extrahiert						7,31	0,141	55,0
Keiner	1	26	$1{,}33 \cdot 10^{-2}$	1,0	5,7	7,31	0,154	35,7
5 ccm Phosphat	1	26	$1{,}7 \cdot 10^{-2}$	0,38	7,05	7,31	0,134	47,9
10 ccm Phosphat	1	26	$1{,}75 \cdot 10^{-2}$	0,25	7,15	7,34	0,140	54,7
Keiner	2	26	$1{,}3 \cdot 10^{-2}$	1,0	5,7	7,34	0,131	34,9
5 ccm Phosphat	2	26	$1{,}7 \cdot 10^{-2}$	0,392	7,05	7,30	0,137	41,4
10 ccm Phosphat	2	26	$1{,}75 \cdot 10^{-2}$	0,25	7,15	7,36	0,141	48,2

* Die spezifische Leitfähigkeit ist nicht gemessen, sondern aus den Leitfähigkeiten von Puffer einerseits, Muskel andererseits und dem jeweiligen Mischungsverhältnis berechnet.

Tabelle VII. Beeinflussung des *Deuticke*-Effektes durch Kochsaft.

1		2	3	4	5	6	7	8	9
Kochsaft				Extraktion des frischen Muskels					
Tier	Aus Muskel Zustand	$+H_2O$ im Verhältnis $\frac{g\ Brei + g\ H_2O}{g\ Brei}$	p_H	$\frac{Kochsaft}{Kochsaft + Brei + Puffer}$ %	Millimol Na O H / g Brei + Zusatz	p_H	x	$\frac{Extr.\ N}{Muskel\text{-}N}$ %	Unterschied
Frosch	Ermüdet bis zur Starre	2,11	6,44	62	—	7,24	—	58,3	— 2,5
	Unermüdet	2,11	6,41	62	—	7,29	—	60,8	
Kaninchen	Ermüdet auf 15 % Restspannung	2,33	6,86	59	0,011	6,96	$1,64 \cdot 10^{-2}$	65,1	— 2,2
	Unermüdet		6,79		0,012	6,92	$1,67 \cdot 10^{-2}$	67,3	
Frosch	Gealtert 2 Std., 20°	2,66	6,10	59	0,0048	7,10	$1,57 \cdot 10^{-2}$	56,9	— 1,4
	Frisch		6,52		—	7,09	$1,59 \cdot 10^{-2}$	58,3	
Frosch	Gealtert 2 Std., 20° C.	2,38	6,14	60	0,0098	7,14	$1,63 \cdot 10^{-2}$	54,4	— 6,0
	Frisch		7,10		—	7,14	$1,59 \cdot 10^{-2}$	60,4	
Kaninchen	Gealtert 5 Std., 20° C	2,3	6,40	60	—	6,85	$1,52 \cdot 10^{-2}$	55	— 0,1
	Frisch		6,71		—	6,84	$1,52 \cdot 10^{-2}$	55,1	
	Ohne Kochsaft			0	—	7,05	$1,60 \cdot 10^{-2}$	62,2	— 7,2
	Ohne Kochsaft			0	—	7,28	$15,8 \cdot 10^{-2}$	60,3	— 5,0
Kaninchen	Gealtert 5 Std., 20° C	2,25	5,86	62	0,0141	7,16	$1,53 \cdot 10^{-2}$	55,3	— 4,4
	Frisch		6,68		0,0054	7,17	$1,48 \cdot 10^{-2}$	59,7	
	Ohne Kochsaft			0	—	7,26	$1,67 \cdot 10^{-2}$	61	— 2,4
Kaninchen	Gealtert 5 Std., 20° C	2,0	6,13	63	0,0165	7,15	$1,63 \cdot 10^{-2}$	58,6	— 0,0
	Frisch		6,61		0,0108	7,12	$1,57 \cdot 10^{-2}$	58,6	
	Ohne Kochsaft			0	—	7,28	$1,71 \cdot 10^{-2}$	62,3	— 2,3
Kaninchen	Gealtert 5 Std., 20° C	2,0	5,87	60	0,017	7,16	$1,70 \cdot 10^{-2}$	60	— 1,5
	Frisch		6,87		0,005	7,10	$1,60 \cdot 10^{-2}$	61,5	

lösung bleibt (Spalte 1 bis 4, Versuch 3) oder nach 2 Stunden Schütteln bei 0° C entfernt ist (Spalte 5 und 6). Verdünnungen mit dem gleichen bis dreifachen Volumen des Puffers verzögern die Alterung entsprechend der Verdünnung (Tabelle VI)[1].

Eine zweite Möglichkeit zukünftiger Aufklärung wäre die Auffindung des Reaktionspartners des Myosins bei der *Deuticke*-Reaktion.

Werden — statt aus Phosphat und Wasser — Extraktionslösungen aus Phosphat und Kochsaft hergestellt, so löst sich frischer Muskelbrei in Kochsaft aus ermüdetem oder gealtertem Muskel stets weniger als in Kochsaft aus frischem Muskel (Tabelle VII).

Das gleiche scheint für Preßsaft aus gealtertem Muskel zu gelten, der mit Aceton enteiweißt ist, wenn man mit gewöhnlicher Extraktionslösung vergleicht (Versuch 4). Aber alle diese Unterschiede sind meist so klein, daß sie auf der Verschiedenheit der Ionalität beruhen können (trotz künstlicher Angleichung von p_H und $\varkappa$). Denn in diesen Extraktionssystemen stammt etwa die Hälfte der Ionen aus den Muskelsäften mit ihren stoffwechselbedingten Unterschieden des Ionenbestandes.

Versuch 4.

Wirkung des Preßsaftes aus gealtertem Muskelbrei.

Frischer Brei ist geschüttelt					Eigenschaften des Extraktes			
mit	Dauer Min.	Temperatur ° C	$\varkappa$	Brei / Brei + Zusatz	$\varkappa$	p_H	NaOH**	Extr. N / Muskel-N %
	Sofort extrahiert				$1{,}69 \cdot 10^{-2}$	7,16	—	61,7
Preßsaft*	90	0	$1{,}32 \cdot 10^{-2}$	0,163	$1{,}85 \cdot 10^{-2}$	7,06	0,036	57,8
„	90	20	$1{,}33 \cdot 10^{-2}$	0,159	$1{,}86 \cdot 10^{-2}$	7,05	0,036	58,3
K-Phosphat ..	90	0	$1{,}32 \cdot 10^{-2}$	0,156	$1{,}81 \cdot 10^{-2}$	7,15	—	63,8
„	90	20	$1{,}33 \cdot 10^{-2}$	0,154	$1{,}82 \cdot 10^{-2}$	7,16	—	63,6

* Der Preßsaft ist genau neutralisiert. — ** $NaOH = \frac{\text{Millimol NaOH}}{\text{g Brei + Zusätze}}$. Die Verdünnung bei der Extraktion schwankte zwischen den Werten 0,14 und 0,15.

Es ist also nicht sicher, daß in enteiweißte Säfte ermüdeter oder gealterter Muskulatur überhaupt *Deuticke*-wirksame Stoffe übergehen.

Experimenteller Teil.

1. Schreibung der Spannungskurve.

a) Operative Vorbereitung.

Die Kaninchen erhalten eine leichte Basisnarkose mit Äthylurethan und während aller schmerzhaften Eingriffe kurzdauernde Zusatznarkose mit Äther. Die Frösche werden nur mit Äther narkotisiert.

[1] Die Alterung bei zu geringer Verdünnung ist offenbar schuld, daß *J. T. Edsall* stärkere Verdünnung für die Extraktion unveränderten Myosins vorschreiben muß (J. of biol. Chem. **89**, 289, 1930.)

Die Haut und die Ansatzstelle des oberflächlichsten Glutealmuskels der Kaninchen wird unmittelbar hinter dem tuber ossis acetabuli (distal) mit einem Schnitt von 2 bis 3 cm Länge quer durchtrennt. Die Blutung ist minimal. Der Muskel wird am distalen Schnittrand gehoben, dann ist der nervus ischiaticus in einem Abstand von 3 bis 4 cm in Richtung zum tuber ossis ischii sichtbar. Der Nerv wird mit dem Haken angehoben und mit Scherenschnitt durchtrennt.

Am lig. inguinale werden arteria und vena femoralis und Nerv voneinander isoliert. Der Nerv wird durchschnitten und an der Arterie oberhalb ihrer Oberschenkeläste nach Bedarf eine Klemme angelegt.

Die Haut an der Medianseite des Kniegelenks wird vom Gelenk aus annähernd parallel der Tibia in einer Länge von 6 bis 7 cm durchtrennt (Schonung der vena saphena!). Die Sehnen, die von der Oberschenkelmuskulatur zum Unterschenkel führen, werden an der Medianseite des Gastrocnemius durchschnitten (m. gracilis, sartorius und biceps femoris).

Nach Zurückschieben des oberen Hautrandes wird die Quadricepssehne dicht oberhalb der Patella und der Extensorenansatz etwa 2 cm unterhalb der Patella durchschnitten (die Durchschneidung der Extensorensehnen am Fußgelenk blutet stark). Zuletzt wird die Aponeurose des m. tensor fasciae cruris am Tibiakamm durchtrennt. Damit sind die mittelbaren und unmittelbaren Einwirkungen der Oberschenkelmuskeln auf Tibia und Fuß aufgehoben. Einige Glasröhren werden mit ihrem verbreiterten Rand auf den Bauch der Triceps-Peronaeusgruppe aufgesetzt und um ihr anderes Ende herum wird die Haut vernäht. Die Röhren dienen zur Einführung der drei oberen Einstichelektroden. Die unteren Reizelektroden werden einfach durch die Haut in die Achillessehne gestochen.

b) Spannungsschreibung.

Die Tibia des Arbeitsbeines (Kaninchen in Rückenlage etwa nach *Asher*) wird derart festgeklemmt, daß der Unterschenkel annähernd waagerecht liegt und die Flexorengruppe frei beweglich bleibt. Die Achillessehne wird unmittelbar am Calcaneus mit einer Nadel durchstochen. An

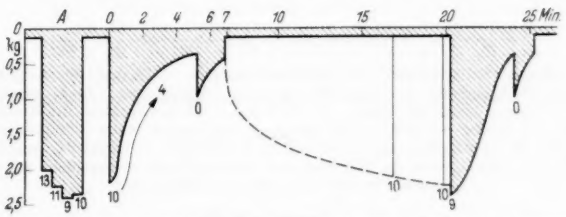

Abb. 3. Ermüdung und Erholung der Spannungsleistung. Ordinate: Spannung in kg; Abszisse: Zeit. Die Grundspannung beträgt 0,1 kg. Die Spitzen der einzelnen tetanischen Zacken sind durch den Kurvenzug verbunden. Die Zahlen am Kurvenzug bedeuten den Rollenabstand des Induktoriums in cm, mit dem jeweils gereizt ist. *A* = Ermittelung des Maximalreizes; Minute 0 bis 7 und 20 bis 25 = Ermüdungsperioden (anaerob). Minute 7 bis 20 = Erholung bei Durchblutung.

ihren beiden Enden greift ein Doppelhaken an, der durch einen 0,2 mm dicken Draht mit dem Spannungshebel verbunden ist.

Für jedes kg Spannung verkürzt sich der Muskel um 1,7 mm, schlägt die Schreibspitze um 67 mm aus. Der Muskel wird zu Beginn der Arbeits-

periode auf eine Grundspannung von 0,1 bis 0,15 kg gebracht, die tetanische Maximalspannung beträgt dann 2 bis 3 kg.

Die Reizung erfolgt durch Induktionsstrom mit einer Frequenz von 30 Reizen (Frosch) oder 60 Reizen (Kaninchen) in der Sekunde. Ein Tetanus von 1 Sekunde wechselt mit einer Pause von 1 Sekunde.

Es wird mit eben maximal wirksamen Induktionsströmen gereizt. Mit der Ermüdung werden auch die Stromstöße vorsichtig verstärkt, da auch die Erregbarkeit ermüdet. Die Größe der Gesamtspannung (Grundspannung + Spannung der Kontraktion) über zwei Ermüdungsperioden und eine Erholungsperiode ist aus Abb. 3 zu ersehen. In den Ermüdungsperioden wird die Durchblutung abgeklemmt, in den Erholungsperioden eröffnet.

In der Regel wird nach der ersten Ermüdung deren vollständige Reversibilität für den gewählten Ermüdungsgrad geprüft, nach der zweiten Ermüdung die Kolloidlöslichkeit. — In der Erholungsperiode erholt sich nicht nur die Arbeitsfähigkeit des Muskels, sondern auch seine Reizempfindlichkeit. Dieses geht aus den Zahlen am Kurvenzug der Abb. 3 hervor.

2. Die Zustandsänderungen während der Ruheanaerobiose.

Vom Ende der Ermüdung bis zum Beginn der Extraktion ist der Muskel anaerobiotisch. Die Entscheidung darüber, wie weit die Extraktion den Muskelzustand am Ende der Ermüdung faßt, hängt davon ab, wie schnell der Muskel altert oder wie weit er sich anaerob wieder zu erholen vermag.

Die Zustandsänderungen sind verschieden beim isolierten Muskel und beim Muskel im lebenden Tier. Im lebenden Kaninchen tritt

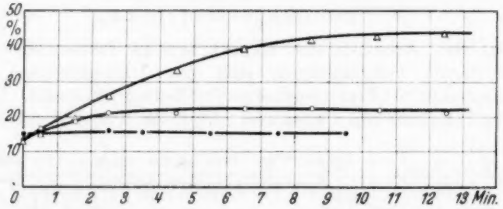

Abb. 4. Anaerobe Erholung und vegetatives Nervensystem. Ordinate: Spannung in % der „unermüdeten" Spannung; Abszisse: Zeit. △——△ lebendes Tier, arteria cruralis abgeklemmt, m. triceps des linken Beines. ○——○ 8 Min. nach Herausnahme des Herzens, sonst wie vorher, der Muskel hat sich vor Herausnahme des Herzens unter Durchblutung völlig wieder erholt. ●——● 25 Min. nach Herausnahme des Herzens, m. triceps des rechten Beines. Die Kurven geben jeweils die Erholung nach vorhergegangener Ermüdung auf einen Spannungsrest von 14 % der Anfangsspannung.

beträchtliche anaerobe Erholung ein, solange der Kreislauf im übrigen Tier in Ordnung ist — trotz seiner Ausschaltung in der arbeitenden Extremität (Abb. 4, Kurve 1). Die Erholung wird geringfügig 8 Minuten nach Herausnahme des Herzens (Kurve 2) und bleibt 20 Minuten nach dieser Operation ganz aus (Kurve 3). Daß die Fähigkeit zu anaerober Erholung nach Entfernung des Herzens erst allmählich erlischt, beweist, daß es sich wirklich um eine anaerobe Erholung handelt und nicht um eine Wirkung minimaler Blutversorgung durch Anastomosen. Da der

n. isch. durchschnitten ist, scheint es sich um eine Wirkung des vegetativen Systems auf den anaeroben Stoffwechsel zu handeln, die mit Erstickung der Zentren langsam abklingt. — Beim isolierten und ermüdeten Froschmuskel nimmt die Spannungsleistung während der Anaerobiose langsam weiter ab.

Die Reizempfindlichkeit erholt sich ebenfalls anaerob beträchtlich — sogar beim kurarisierten Muskel. Am Schluß eines ermüdenden Tetanus ist z. B. die Spannung bei Reizung mit Rollenabstand 10 cm viel kleiner als bei Reizung mit Abstand 4 cm, 8 Minuten später sind beide Reizerfolge wieder gleich.

Die kolloidalen Änderungen, soweit sie überhaupt faßbar sind, setzen verhältnismäßig spät ein. Im unzerschnittenen Muskel beginnt die Löslichkeitsänderung überhaupt erst nach Stunden. Im Brei des unermüdeten Muskels setzt die Alterung bei 20° C erst nach etwa 1 Stunde ein; beim ermüdeten Muskel sind allerdings die Kolloide schon nach 10 Minuten in Alterung begriffen (Abb. 2). Aber selbst wenn man annimmt, daß bei Beginn der Zerkleinerung beide Muskeln gleich löslich gewesen wären, würde die Löslichkeit des ermüdeten Muskels während der ersten 10 Minuten — d. h. in der Zeit bis zum Beginn der ersten Extraktion — sich nur um etwa 3% des Gesamteiweißes erniedrigt haben. Die Langsamkeit kolloidaler Änderungen auch bei ermüdeten Muskeln folgert auch aus der Übereinstimmung der Mastikatorversuche mit den Versuchen, bei denen in flüssiger Luft zerkleinert wird.

3. Die Jodacetatvergiftung.

Der vergiftete Ruhemuskel ist vor der Vergiftung entnervt, der unvergiftete Vergleichsmuskel vorher amputiert. Der Vergiftungserfolg ergibt sich aus der vollständigen Starre der übrigen Muskeln.

4. Die Extraktion.

Wirklich *gleichmäßige* Zerkleinerung in flüssiger Luft erfordert für größere Muskelmengen außerordentlich viel Zeit. Deshalb empfiehlt es

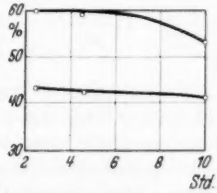

Abb. 5. Mechanische Denaturierung des Myosins. Ordinate: Löslicher N in % des Muskel-N. Abszisse: Zeit. Obere Kurve: Myosinreicher Extrakt (Myosin = 22,1 % des Gesamt-N). Untere Kurve: Myosinarmer Extrakt (Myosin-N = 4 % des Gesamt-N.)

sich beim Kaninchen meistens, bei chemischer Aufarbeitung mit den großen notwendigen Muskelmengen immer, mit Hilfe eines Mastikators Muskelbrei

herzustellen. Gastrocnemien des Frosches werden immer in flüssiger Luft zerkleinert.

Wenn die Extraktion mit etwa einem Teil Brei auf 6 bis 10 Teile Lösung bei 0 bis 2° C im Rotationsapparat stattfindet[1], ist das Lösungsgleichgewicht nach $1^1/_2$ bis 2 Stunden erreicht. Etwa nach der vierten Stunde beginnt das Myosin myosinreicher Lösungen bei raschem Trudeln der Extraktionsgläser langsam zu denaturieren (vgl. Abb. 5). Bei sanftem Schütteln — etwa mit der Hand — wird das Gleichgewicht erst viel später erreicht und die Denaturierung bleibt aus. Die Trennung von extrahiertem Brei und Extrakt erfolgt durch Zentrifugieren.

5. Die Extraktionslösungen.

Als Extraktionslösung wird eine Lösung von 0,133 mol. K-Phosphat von p_H 7,64 (prim. : sek. Phosphat = 1 : 7, Ionenstärke = 0,37 μ) verwendet. Der Extrakt hat dann ein $p_H \sim 7{,}3$. Ein derartiger Puffer löst aus frischem Kaninchenmuskel 50 bis 60 % des Gesamtstickstoffs gegenüber etwa 85 %, die bei vollständiger Extraktion durch eine 0,6 mol. KCl-Lösung von p_H 9 extrahierbar sind. (Beim Froschmuskel hängen die gelösten Mengen vom Ernährungszustand ab.) Die Minderlöslichkeit betrifft das Myosin, von dem anstatt 35 % des Gesamtmuskel-N nur etwa 15 bis 25 % extrahiert werden und das Globulin X, von dem statt 19 % nur 3 bis 6 % des Gesamt-N auftreten.

Die von *H. J. Deuticke*[2] angegebene Phosphatlösung mit K-Jodid extrahiert ihrer geringeren Ionenstärke wegen — $\mu = 0{,}3$ — aus frischem Muskel etwa 5 bis 10 % des Gesamt-N weniger und der Unterschied der Extraktionsfähigkeit für ermüdeten und unermüdeten Muskel ist geringer[3] (s. Tabelle VIII). Da außerdem Jodid — wenigstens in höherer Kon-

Tabelle VIII. Vergleich der Extraktionslösungen nach *Meyer-Weber* (M. W.) und *Deuticke* (D.).

Zustand des Muskels	p_H der M. W.-Lösung	p_H der D.-Lösung	Gelöster N / Muskel-N nach M. W. %	Gelöster N / Muskel-N nach D. %	Unterschied ermüdet — unermüdet nach M. W. %	Unterschied ermüdet — unermüdet nach D. %
Ermüdet	7,25	7,22	40,3	38,0	— 8,7	— 5,5
Unermüdet ...	7,22	7,21	49,0	43,5		
Ermüdet	7,23	7,21	48,1	42,3	— 5,9	— 3,7
Unermüdet ...	7,23	7,23	54	46		

[1] *K. Meyer* u. *H. H. Weber*, diese Zeitschr. **266**, 137, 1933. — [2] Zeitschr. f. physiol. Chem. **210**, 97, 1932. — [3] Daß die jodidhaltige Lösung in der Anordnung von *Deuticke* besonders große Unterschiede ergibt, dürfte damit zusammenhängen, daß er Brei und Extrakt durch Filtration trennte. Im Filterpapier tritt nämlich eine Denaturierung des Myosins ein. Hiervon wird der unermüdete myosinreichere Muskel stärker betroffen und so der Unterschied zu klein gefunden, falls die Lösung jodidfrei ist. Durch das Jodid bleibt weniger Myosin auf dem Filter, so daß in diesem Falle die Verkleinerung des Unterschiedes fortfällt. Dieser Vorteil des Jodids verschwindet, wenn das Ungelöste abzentrifugiert wird.

zentration — die Doppelbrechung des Myosins vernichtet[1], sind solche Extrakte für die Trennung der einzelnen Muskeleiweißkörper ungeeignet.

Für die Herstellung von Extraktionslösungen mit Kochsaft wird der Muskelbrei in Einzelportionen von weniger als 1 g bis zur Gesamtmenge von 10 g unter Schütteln in siedendes Wasser eingetragen. Hierdurch wird sofortige Durchwärmung erreicht. Das Gesamtsystem — 10 g Muskel + 20 g H_2O — wird bis auf ein Gesamtgewicht von 25 g eingekocht. Ermüdeter und unermüdeter Muskel werden gleich behandelt. Dann wird zentrifugiert und das Zentrifugat auf p_H 7 neutralisiert. Gelegentlich wird das Zentrifugat zwecks vollständiger Enteiweißung vorher auf p_H 5,2 bis 5,3 angesäuert, noch einmal gekocht und filtriert. Die Kochsäfte werden dann mit K-Phosphat gemischt — in der Regel im Verhältnis 2 : 1. Hierbei wird der Kochsaft als ein K-Phosphatpuffer von der Konzentration angesehen, die in reinem K-Phosphat derselben Leitfähigkeit vorhanden ist. Infolgedessen wird der Anteil an Phosphat*stamm*lösung so weit vermindert, daß die Gesamtleitfähigkeit dieselbe bleibt wie immer. Es wurde dabei nicht versucht, in solcher Extraktionslösung *genau* die gleiche Leitfähigkeit zu bekommen wie in den anderen Versuchen dieser Arbeit. Abweichungen zwischen 0 und 15 % wurden in Kauf genommen. Dagegen wurde darauf geachtet, daß die Vergleichsansätze desselben Versuchs um höchstens 5 bis 7 % in ihrer Leitfähigkeit voneinander abwichen. Bei der Herstellung von Extraktionslösungen mit Preßsaft wird der gealterte Brei mit der gleichen Menge an Aceton vermengt. Diese Mischung wird dann in etwa 5 Minuten ausgepreßt. Das Aceton wird im Vakuum bei 20 bis 21° C verjagt. Man bekommt dann eine Preßsaftmenge, die etwa $^3/_5$ der ursprünglichen Breimenge beträgt. Auch dieser Preßsaft wird mit NaOH auf ein $p_H \sim 7$ neutralisiert und ebenfalls mit Phosphatstammlösung auf die übliche spezifische Leitfähigkeit gebracht.

6. Die Trennung des Myosins von den löslichen Eiweißkörpern und dem Rest-N.

Die Konzentration des gesamten löslichen N wird im aliquoten Teil des Zentrifugats sofort, die Konzentration des Rest-N in einem anderen Teil nach Enteiweißung mit Sulfosalicylsäure bestimmt. Für die Trennung des Myosins von den löslichen Eiweißkörpern wird der Hauptteil des Extrakts durch Dialyse gegen das 15fache Volumen einer m/120 K-Phosphatlösung (p_H 6,0) auf p_H 6,9 und etwa $3{,}3 \cdot 10^{-2}$ μ (ungefähr 0,02 mol.) gebracht. Das Myosin wird abzentrifugiert.

Bei weiterer Dialyse bleibt das Dialysat bis über $\mu = 6{,}9 \cdot 10^{-3}$ hinaus klar, beginnt die Ausfällung des Globulin X in drei Versuchen erst bei $\mu = 5 \cdot 10^{-3}$ und beträgt etwa 4 % des Gesamt-N bei $\mu = 6{,}8 \cdot 10^{-5}$. Wird ein aliquoter Teil des Dialysats von $\mu = 3{,}3 \cdot 10^{-2}$ über die ganze Zeit der Dialyse bei derselben Temperatur aufgehoben, so bleibt er klar. Hiermit ist die Fällungslücke zwischen Myosin und Globulin X und damit auch die Möglichkeit zu sauberer Trennung aufs

[1] *A. v. Muralt* u. *J. T. Edsall*, J. of biol. Chem. **89**, 351, 1930; sowie *J. T. Edsall* u. *J. W. Mehl*, ebenda **133**, 409, 1940.

neue gesichert. Die früher gegebenen Werte[1] für die Mengen der einzelnen Muskeleiweißkörper, die auf diesem Trennungsverfahren beruhen, scheinen damit ihre Gültigkeit gegenüber etwas anderen Angaben der jüngsten Zeit[2] zu behalten.

7. Berechnung der Ergebnisse.

Die der Analyse dienenden Mengen werden gravimetrisch bestimmt. Die Konzentrationsangaben beziehen sich infolgedessen auf Gramm Lösung und Gramm Brei. Die extrahierte Stickstoffmenge wird unter Vernachlässigung des sehr kleinen „nichtlösenden Raumes" als Produkt der Konzentration im Extrakt und des Gesamtgewichts des Systems (Extrakt + Brei) gewonnen.

Wir bezeichnen mit C die Konzentrationen und mit G die Gewichte. Wir geben durch Indizes an, worauf sich die Konzentrationen und Gewichte beziehen. Die Indizes bedeuten: B = Brei, E = Extrakt, El = Extraktionslösung, G = Myosingel, D = Dialysat, A = Außenlösung, RN = Reststickstoff.

Dann ist der Anteil des gelösten N am Gesamt-N der extrahierten Muskelmenge in %:

$$\frac{C_E\,(G_{El}+G_B)}{C_B\cdot G_B}\cdot 100. \quad \text{Der Anteil des Rest-N:}\quad \frac{C_{RN}\cdot S\,(G_{El}+G_B)}{C_B\cdot G_B}\cdot 100.$$

(S ist der Korrekturfaktor für die Sulfosalicylsäure, die zur Enteiweißung zugesetzt wird. Ihr Gewicht beträgt 10 % des aliquoten Teiles, der zur Rest-N-Bestimmung dient.)

Das Gewicht des Extrakts wird durch die Dialyse und durch das Herausspülen des Myosingels (mit Außenlösung der Dialyse) größer. Darum muß die Konzentration des löslichen Stickstoffs im Dialysat auf das ursprüngliche Extraktgewicht umgerechnet werden — durch Multiplikation mit dem Faktor: $G_{D\text{ am Schluß}} : G_{D\text{ am Anfang}}$.

Da sich der Reststickstoff bei der Dialyse auf Dialysat und Außenlösung gleichmäßig verteilt, muß sein Anteil am Dialysat aus der Rest-N-Konzentration des Extrakts berechnet werden durch Multiplikation mit dem Faktor $G_{D\text{ am Anfang}} : G_{D\text{ am Anfang}} + G_A$. Der Anteil des löslichen am Gesamt-N des Muskels ist dann:

$$\frac{\left(\dfrac{C_D\cdot G_{D\text{ am Schluß}}}{G_{D\text{ am Anfang}}} - \dfrac{C_{RN}\cdot G_{D\text{ am Anfang}}}{G_{D\text{ am Anfang}}+G_A}\right)\cdot (G_{El}+G_B)}{C_B\cdot G_B}\cdot 100.$$

Das abzentrifugierte Myosingel wird mit etwas überstehendem Dialysat als Ganzes verascht. Wir bezeichnen die erhaltene Stickstoffmenge mit Mm N (= Millimol N). Diese Stickstoffmenge umfaßt außer dem Myosin-N den Stickstoff des Dialysatanteils, der in und über dem Gel mitverascht

[1] *K. Meyer* u. *H. H. Weber*, diese Zeitschr. **266**, 137, 1933. — [2] *E. C. Bate Smith*, Proc. of the roy. soc. series B. **124**, 136, 1937.

worden ist. Unter Vernachlässigung des sehr kleinen „nichtlösenden Raumes" und des kleinen Gewichts des Myosins selbst wird angenommen, daß dieser Dialysatanteil gleich dem Gesamtgewicht des veraschten Systems ist ($= G_G$). (Das Myosingewicht beträgt im allgemeinen nur 2 bis 3% des Gesamtgewichts.) Die Myosinmenge des aliquoten Teiles des Extrakts, der zur Dialyse kommt, wird auf die Gesamtmyosinmenge des Extrakts umgerechnet durch Multiplikation mit dem Faktor: $\frac{G_{El} + G_B}{G_{D \text{ am Anfang}}}$. Der Anteil des extrahierten Myosins am Muskel-N ist dann in %:

$$\frac{(Mm\ N - C_D \cdot G_G)\ (G_{El} + G_B)}{C_B \cdot G_B \cdot G_{D \text{ am Anfang}}} \cdot 100.$$

8. *Meßmethoden.*

Das p_H wird in U-Elektroden mit der Gaskette nach *Michaelis* gemessen. Beim *Kjeldahl*-Verfahren liegen die N-Mengen des Einzel-*Kjeldahl*s zwischen 0,5 und 1 Millimol N, beträgt die Fehlergrenze $\pm$ 0,5%, werden Doppelbestimmungen zugrunde gelegt. Also ist der wahrscheinliche Fehler kleiner als 1%.

Zusammenfassung.

Eine physiologische Änderung der Muskelkolloide ist ihre Gestaltsänderung bei der Kontraktion. Die andere physiologische Änderung ist die von *Deuticke* entdeckte Änderung ihrer Löslichkeit. Kontraktionsfähigkeit und Löslichkeit ändern sich durch Muskelarbeit. Beide werden durch Ermüdung kleiner.

Es wird gezeigt:

1. Im lebenden Tier sind beide Änderungen aerob in Sekunden weitgehend, in Minuten vollständig reversibel.

2. Beide Änderungen werden erst bei fortgeschrittenerer Ermüdung deutlich fühlbar.

3. Die von *Deuticke* entdeckte Löslichkeitsminderung ist der Ermüdungsrückstand einer Kolloidreaktion. Diese läuft *vor* allen bekannten Stoffwechselprozessen ab und wird im unermüdeten Muskel schon durch den anaeroben Stoffwechsel wieder rückgängig gemacht. Diese Kolloidreaktion gleicht hierin der Kolloidreaktion, auf der die Kontraktion beruht, während der *Deuticke*-Effekt mehr dem Verkürzungsrückstand der Kontraktion gleicht.

4. Auch die Löslichkeitsänderung ist — genau wie die Änderung der Kontraktionsfähigkeit — *a'lein* eine Änderung des Muskeleiweißkörpers Myosin.

5. Die schon länger bekannte Löslichkeitsminderung im zerschnittenen Muskel und die Löslichkeitsminderung durch Ermüdung können sich gegenseitig vertreten.

6. Der Löslichkeitseffekt beruht nicht auf der stoffwechselbedingten Änderung des Ionenbestandes des Muskels, insbesondere nicht des p_H.

7. Die Löslichkeitsminderung kann im alternden Muskelbrei durch steigende Verdünnung verzögert und schließlich aufgehoben werden.

8. Es werden Versuche über die Beeinflussung der Löslichkeit frischer Muskeln durch Kochsäfte und Preßsäfte aus gealtertem Muskelbrei oder ermüdetem Muskel mitgeteilt.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. *H. H. Weber* für Thema, Hilfe und Beratung sehr herzlich zu danken.

Mikrotitration von Ferrocyanid mit Permanganat bei der Bestimmung des Blutzuckers.

Von

M. Fiorentino und **P. Boni.**

(Aus den Laboratorien für Biochemie der Ospedali Riuniti, Napoli.)

(Eingegangen am 12. November 1940.)

Um das Verfahren von *Miller* und *Van Slyke*[1] zur Bestimmung des Blutzuckers einfacher und sparsamer zu gestalten, haben wir eine Modifikation ausgearbeitet, bei der das Cer^{IV}-Sulfat durch Kaliumpermanganat ersetzt wird.

Bezüglich der manganometrischen Mikrotitration von Ferrocyaniden verweisen wir auf die unlängst erschienenen Veröffentlichungen von *De Beer* und *Hjort* und von *Brennecke*, hier soll nur die Technik unserer Methode beschrieben werden, welche ausgezeichnete Ergebnisse geliefert hat.

Beschreibung der Methode.

Reagentien.

A. Saure Cadmiumsulfatlösung.

13 g $3\,CdSO_4 . 8\,H_2O$ rein, p. a., und 63,5 ccm genau normale H_2SO_4 werden mit destilliertem Wasser auf 1000 ccm aufgefüllt. Die Normalschwefelsäure muß auf die Anwesenheit reduzierender Substanzen geprüft werden; man fügt zu 20 ccm der obigen Lösung 60 ccm destilliertes Wasser und 0,05 ccm 0,1 n Kaliumpermanganatlösung zu, dessen Rosafarbe mindestens 5 Minuten bestehen bleiben muß.

B. 0,275 n Natriumhydroxydlösung (aus Natrium).

C. Bariumcarbonat, reinst, in Pulverform.

D. Alkalische Kaliumferricyanidlösung.

Ungefähr 5 g $K_3Fe(CN)_6$, rein, p. a., und 10,6 g Natriumcarbonat werden in destilliertem Wasser gelöst und auf 1000 ccm aufgefüllt. Vor Licht und Staub geschützt hält sich diese Lösung einige Monate.

E. Schwefelsäure, etwa 18 n.

Man fügt 465 ccm H_2SO_4 konz. — spezifisches Gewicht 1,84 — zu 535 ccm destilliertem Wasser (Prüfen auf die Anwesenheit reduzierender Substanzen wie oben).

---

[1] Ungefähr gleichzeitig mit *Miller* und *Van Slyke* haben auch *Giragossintz*, *Kirk* und *Davidson* eine Methode zur Titration des Ferrocyanids mittels Cersalzen bei der Glucosebestimmung ausgearbeitet.

F. Indikatorlösung.

Ungefähr 100 mg Setopaline conc.[1] in 100 ccm destilliertem Wasser auflösen. Haltbarkeit einige Wochen.

G. 0,1375 n Kaliumpermanganat-Stammlösung.

Ungefähr 6,5 g $KMnO_4$ in destilliertem Wasser lösen, auf 1000 ccm auffüllen, filtrieren und 2 Stunden auf das siedende Wasserbad stellen; nach 24 Stunden gegen 0,1 n Oxalsäure bzw. in Indikatorgegenwart gegen 0,1 n Kaliumferrocyanidlösung oder Lösung von *Mohr*schem Salz titrieren. Die Normalität der $KMnO_4$-Lösung sei z. B. zu 0,1985 gefunden; um daraus die endgültige $KMnO_4$-Lösung von 0,1375 n zu erhalten, muß man lediglich $\frac{0{,}1375}{0{,}1985} \cdot 1000 = 693$ ccm mit dest. Wasser auf 1000 ccm verdünnen.

Bei Licht- und Staubabschluß ist diese Lösung unverändert mehrere Monate haltbar.

H. Verdünnte 0,00275 n $KMnO_4$-Lösung.

Diese wird erst unmittelbar vor Gebrauch hergestellt, indem mit einer *Ostwald*-Pipette genau 2 ccm der Stammlösung G in einen auf 100 ccm geeichten Kolben abgemessen und mit destilliertem Wasser zur Marke aufgefüllt wird.

Die angegebene Verdünnung wurde gewählt, da jedem 0,01 ccm derselben 1 mg Glucose auf 100 ccm Blut entspricht, wenn die Bestimmung an Blutproben von 0,1 ccm durchgeführt wird.

Ausführung.

Man gibt in ein Reagensglas 4 ccm Reagens A und fügt 0,1 ccm Fluoridblut zu, das in einer Präzisionsmikropipette abgemessen wurde; sobald dieses letztere hämolysiert, wobei es die Mischung braun färbt, setzt man 2 ccm Reagens B zu und schüttelt gut durch. Das Reagensglas wird sodann zuerst auf dem siedenden Wasserbad 3 Minuten erwärmt, darauf unter fließendem Wasser 2 Minuten abgekühlt.

In jedes Röhrchen wird dann 0,3 g Bariumcarbonat gegeben und ungefähr 12 Minuten lang sorgfältig durchgemischt, darauf durch einen Wattebausch[2] in ein Probegläschen von 50 ccm Inhalt filtriert. Das zur Enteiweißung benutzte Reagensglas wird darauf dreimal hintereinander ausgespült, jedesmal mit 4 ccm destilliertem Wasser.

[1] Setopaline conc. wird von der I. R. Geigy, S. A., Basel, Schweiz, hergestellt. Statt dessen können wohl ebensogut unter den gleichen Bedingungen Eriogrün und Erioglaucin angewendet werden, die fast dasselbe Redoxpotential besitzen. — [2] Von der hydrophilen Watte werden ungefähr 4 bis 6 mg für jede Probe verwendet, nachdem sie vorher lange mit Leitungs- und destilliertem Wasser gewaschen und vor Staub geschützt getrocknet wurde. Man arbeitet mit kleinen Trichtern von 4 cm Durchmesser, mit engem Hals. Nach beendigter Filtration wird der Wattebausch vorsichtig mit einer Nadel angehoben, damit die im Trichterhals verbliebene Flüssigkeit in das darunterstehende Probegläschen abfließen kann.

und zwar läßt man zwischen dem Aufgießen der einzelnen Waschwässer aufs Filter jedesmal so viel Zeit verstreichen, daß die Flüssigkeit inzwischen möglichst vollkommen durch den Trichter abfließen kann.

Die ganze Operation ist in etwa 20 Minuten beendet, auch wenn sie an 20 bis 30 Proben gleichzeitig durchgeführt wird. In das Probegläschen, welches das Filtrat enthält, werden etwa 2 ccm Reagens D eingemessen, nach dessen Zugabe die Flüssigkeit vollkommen klar bleiben muß, was die vollständige Entfernung des Cadmiums anzeigt. Darauf wird das Probegläschen 15 Minuten lang auf das siedende Wasserbad und nachher 3 Minuten unter fließendes kaltes Wasser gebracht.

Die Titration muß innerhalb einer Stunde durchgeführt werden. Unmittelbar vor der Titration jeder Probe wird 1 ccm 18 n H_2SO_4 und 7 Tropfen Indikator zugesetzt und darauf unter Benutzung einer in 0,01 ccm eingeteilten Mikrobürette mit Lösung H titriert, bis der Indikator von hell Grünlichgelb nach Goldbraungelb umschlägt.

Bei etwas Übung gelingt es mit frischer Indikatorlösung, den Umschlagspunkt auf einen halben Tropfen genau zu erfassen. Die Ablesung der verbrauchten Flüssigkeitsmenge an der Bürette abzüglich des Wertes der Leerprobe, in $^1/_{100}$ ccm ausgedrückt, ergibt die Glucosemenge in mg auf 100 ccm Blut. Die Leerprobe wird auf vergleichbare Weise und nach genau derselben Methode wie die oben beschriebenen Bestimmungen durchgeführt — selbstverständlich ohne Zusatz von Blut. Ihre Werte sollten nicht um Beträge über 0,10 ccm schwanken, was eine genügende Reinheit der angewandten Reagentien anzeigt.

Literatur.

Brennecke, E., Oxydations-Reduktions-Indikatoren in „Die Chemische Analyse", **33**, 130. Neuere Maßanalytische Methoden. Stuttgart, F. Enke, 1937. — *De Beer, E. Y.*, u. *A. M. Hjort*, Ind. Eng. Chem., Analyt. Ed. **7**, 120, 1935. — *Giragossintz, G., C. Davidson* u. *P. L. Kirk*, Mikrochem. **21**, 21, 1936/37. — *Miller, B. F.*, u. *D. D. Van Slyke*, J. of biol. Chem. **114**, 583, 1936.

Berichtigung

zu der Arbeit „*Über die rechnerische und experimentelle Bestimmung der zwischen den Zellen in abgepreßter Hefe zurückbleidenden Gär- und Züchtungs-Flüssigkeitsmengen*“ von *Felix Just*[1].

In meiner Arbeit ist mir auf S. 50 ein Versehen unterlaufen, das zwar für alles übrige belanglos ist, aber trotzdem der Ordnung halber berichtigt werden soll.

Die allgemeine Formel für die zu verdampfende Wassermenge W_p, bezogen auf 100 kg Trockengut, muß *richtig* lauten:

$$W_p = \mathbf{100} \cdot \frac{P - p}{p}$$

an Stelle von $W_p = P \cdot \frac{P - p}{p}$. Demgemäß muß es auch heißen: $W_{90} = \mathbf{100} \cdot \frac{90 - p}{p}$, an Stelle von $W_{90} = 90 \cdot \frac{90 - p}{p}$. In der folgenden kurzen Aufstellung sind also die W_{100}-Werte richtig, die W_{90}-Werte aber um $^1/_9$ zu niedrig. Der folgende Satz bleibt dem Sinne nach richtig, muß aber mit den numerisch richtigen Werten (frühere Angaben in Klammern) lauten: „Es lohnte sich also, z. B. eine abgeschleuderte Hefe von etwa 18 % Trockensubstanzgehalt auf z. B. 30 % Trockensubstanz abzupressen, denn im ersten Falle sind für je 100 kg Trockengut (90 %ig) 200 (180) kg Wasser *mehr* [d. i. 100 % (100) *mehr*] zu verdampfen als im zweiten; oder z. B. bei der Eiweißschlempe, die für gewöhnlich etwa 6 bis 8 % Trockensubstanz enthält, würde eine Anreicherung auf z. B. 25 % bedeuten, daß an Stelle von 1400 (1260) bis 1025 (923) kg Wasser nur noch 260 (234) kg zu verdampfen wären.“

[1] Diese Zeitschr. **306**, 33, 1940.